

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

par

Blas TARODO DE LA FUENTE

Sujet :

**Etude de l'hydratation de la caséine
en relation avec les phénomènes
de coagulation acide et enzymatique du lait**

Soutenue publiquement le 29 juin 1973

devant la commission d'examen

MM. C. ALAIS

Professeur

Président

R. GAY

Professeur

E. CHAPON

Professeur

R. FRENTZ

Professeur

} Examinateurs

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

par

Blas TARODO DE LA FUENTE

Sujet :

**Etude de l'hydratation de la caséine
en relation avec les phénomènes
de coagulation acide et enzymatique du lait**

Soutenue publiquement le 23 juin 1973 devant la commission d'examen

MM. C. ALAIS

Professeur

Président

R. GAY

Professeur

E. CHAPON

Professeur

R. FRENTZ

Professeur

} Examinateurs

AVANT PROPOS

Avant d'exposer notre travail, qu'il nous soit permis d'exprimer toute notre gratitude à Monsieur le Professeur C. ALAIS pour la compétence et l'efficacité avec lesquelles il a dirigé nos recherches. Sa grande connaissance de la Science du lait, ses nombreux conseils, son honnêteté et sa rigueur scientifique, son sens de l'organisation et sa clairvoyance dans la conduite de notre groupe de recherche nous ont été infiniment précieux dans le déroulement de nos études.

Nos remerciements vont aussi à Messieurs les Professeurs R. GAY et E. CHAPON, dont nous avons bénéficié de l'enseignement, et qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

Nous exprimons notre sincère reconnaissance à Monsieur le Professeur R. FRENTZ qui nous a guidé au début de nos recherches sur la thrombélastographie.

Ce travail a été en grande partie accompli dans les laboratoires de l'Ecole de Laiterie où nous avons disposé d'un équipement important et moderne. Nous remercions Monsieur le Professeur A. VEILLET, qui en était alors le directeur, pour son appui, ainsi que ses collaborateurs. Nous exprimons en particulier nos remerciements à Mesdames MAUCOURT et HUGUES qui nous ont apporté une efficace aide technique dans cet établissement.

Que Monsieur Y. DOUCET, Professeur à la Faculté des Sciences de Marseille, trouve ici l'expression de nos remerciements pour ses précieux conseils en ce qui concerne la cryoscopie.

Notre sincère reconnaissance va de même à Monsieur le Professeur J. LAGARRIGUE, Chef du Département de Biologie Appliquée de l'I.U.T. de Montpellier, pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son établissement et pour son appui.

Enfin nous remercions et assurons de notre amitié toutes celles et tous ceux, de l'Ecole de Laiterie et du Département de Biologie Appliquée de l'I.U.T. de Nancy, et du groupe de recherche de Biochimie Appliquée, dirigé par Monsieur C. ALAIS, qui, à des titres divers, nous ont encouragé et aidé dans notre tâche.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551912_0048

ETUDE DE L'HYDRATATION DE LA CASEINE EN RELATION AVEC LES PHENOMENES DE
COAGULATION ACIDE ET ENZYMATIQUE DU LAIT

I - INTRODUCTION.

- A - Coagulation du lait.
- B - Synérèse du coagulum.
- C - Structure dipolaire de l'eau et liaison hydrogène.
- D - Hydratation des protéines.
- E - Eau liée et eau d'hydratation.

II - MATERIEL ET METHODES.

A - Laits.

- 1 - Lait normal.
- 2 - Lait concentré.
- 3 - Lait privé de phosphate colloïdal.
- 4 - Lait pasteurisé.

B - Mesure du temps de floculation.

C - Mesure de la coagulation par thrombélástographie.

D - Mesure de la synérèse.

E - Mesure de la fermeté des caillés.

F - Préparation des caillés acides.

G - Dosage des éléments minéraux.

- 1 - Calcium et Magnésium totaux et solubles.
- 2 - Calcium ionique.
- 3 - Phosphore.

H - Courbes de neutralisation et détermination du point isoélectrique apparent des laits.

I - Fractionnement du phosphocaséinate par ultracentrifugation.

J - Dosage de l'eau d'hydratation.

K - Dosage de l'eau liée.

1 - Technique de l'Association of Agricultural Chemists.

2 - Technique utilisant un cryoscope semi automatique.

3 - Calcul de l'eau liée.

L - Electrophorèse en gel d'amidon.

III - RESULTATS.

A - Composition et coagulabilité du lait reconstitué.

B - Validité des méthodes utilisées.

1 - Technique thrombélastographique.

2 - Ultracentrifugation.

3 - Cryoscopie.

4 - Absorption atomique.

C - Hydratation des caséines.

1 - Composition et hydratation des micelles de phosphocaséinate dans les laits normal et concentré.

2 - Composition du sédiment et hydratation du phosphocaséinate en fonction de la teneur en matière sèche du lait.

3 - Composition du sédiment et hydratation du phosphocaséinate en fonction du pH du lait.

4 - Composition du sédiment et hydratation du phosphocaséinate en fonction du calcium du lait.

5 - Composition du sédiment et hydratation du phosphocaséinate en fonction du chauffage du lait.

6 - Analyse électrophorétique des sédiments.

D - Etude du lait concentré.

- 1 - Influence de la concentration sur le point isoélectrique.
- 2 - Influence de la concentration sur le pouvoir tampon.
- 3 - Variation des équilibres salins en fonction de la concentration.
- 4 - Influence de l'acidification sur les équilibres salins.

E - Etude des caillés obtenus par coagulation acide.

- 1 - Obtention et composition des caillés acides.
- 2 - Variation de l'hydratation des caséines dans les laits concentrés maturés.
- 3 - Variation de l'hydratation des caséines dans le caillé en fonction de la dilution du lait concentré.
- 4 - Effets de l'homogénéisation sous pression sur les propriétés physiques des pâtes conventionnelles et "Paracurd".
- 5 - Effets de l'addition d'eau à une pâte "Paracurd" de fort extrait sec.

F - Etude de la coagulation enzymatique.

- 1 - Influence de la température et du temps de conservation du lait.
- 2 - Influence de la température de coagulation.
- 3 - Influence de la concentration en calcium.
- 4 - Influence de l'acidité.
- 5 - Influence de la concentration en matière sèche.
- 6 - Influence de la concentration en présure.

IV - DISCUSSION.

V - CONCLUSION.

VI - RESUME.

VII - BIBLIOGRAPHIE.

I - INTRODUCTION

L'étude de l'hydratation de la caséine en relation avec les phénomènes de la coagulation du lait normal ou concentré montre que tous les facteurs physiques, chimiques ou physicochimiques qui interviennent dans les processus de la coagulation et de la synérèse ont également une nette influence sur l'hydratation.

Il en résulte qu'il est impossible d'isoler l'eau d'hydratation en tant que facteur de coagulation et que l'on ne peut espérer obtenir des conclusions si l'on ne connaît pas parfaitement le phénomène de la coagulation d'une part et les variations de l'hydratation d'autre part. C'est pourquoi nous étudierons successivement le phénomène de la coagulation du lait et de la synérèse du coagulum auquel il permet d'aboutir et l'évolution de l'hydratation des caséines du lait en essayant de préciser l'influence intrinsèque de ce facteur.

A - COAGULATION DU LAIT.

L'étude du phénomène de la coagulation du lait par la présure a été entreprise par de nombreux auteurs sous l'angle biochimique ou physique (HANSSON et coll 1949, NITSCHMANN 1949, WAUGH et VON HIPPEL 1956, JOLLES J. et coll 1970, JEN et ASHWORTH 1970, TUSZYNSKI 1971). Leurs conclusions permettent d'expliquer le mécanisme de la coagulation du lait par la présure en faisant intervenir trois phases dans le déroulement du phénomène.

La première phase est constituée par une réaction spécifique de la présure sur la caséine K, réaction qui se déroule déjà rapidement pour un rapport enzyme/substrat de l'ordre de $1/50\ 000$; on la désigne généralement sous le nom de réaction primaire. Au cours de cette réaction un macropeptide, de poids moléculaire supérieur à 5000 et accompagné ou non de glucides est séparé de la "paracaséine" K, par hydrolyse d'une liaison peptidique Phe.Met. (le coefficient de température de cette réaction est compris entre 2 et 3). Le macropeptide passe dans le sérum au cours de l'égouttage alors que la paracaséine K au contraire reste dans le coagulum qu'elle contribue à former par réunion des micelles de caséine entre elles.

Cette réaction primaire est indispensable à la formation du coagulum qui constitue la deuxième phase ou phase de coagulation caractérisée par un coefficient de température élevé (de l'ordre de 1,5 par °C) et par le fait qu'elle nécessite la présence de calcium ionisé.

Cette sensibilité à la température, mise en évidence par BERRIDGE (1942), a été utilisée dans l'élaboration de plusieurs procédés modernes de fromagerie pour se rendre maître du moment de la coagulation. Il suffit en effet d'emprésurer à basse température ($\sim + 4^{\circ}$) pour que seule la réaction primaire ait lieu ; après un temps d'action de la présure suffisamment long, un simple réchauffage suffit pour provoquer la coagulation instantanée.

En pratique, le début de la coagulation est matérialisé au laboratoire par la "floculation" correspondant à l'apparition d'une infinité de flocons dans une couche mince de lait, et en usine par la "prise" du lait en un gel homogène. Le temps écoulé entre l'emprésurage et cette floculation est le "temps de floculation". La fin de la coagulation correspond au moment où le gel a acquis ses propriétés mécaniques maximales. Elle est mesurée par le "temps de coagulation" compté lui aussi à partir de l'emprésurage.

La troisième phase est constituée par une réaction de protéolyse générale, non spécifique, de la présure sur les différentes caséines. C'est une réaction très lente avec les doses d'enzyme utilisées en pratique ; elle débute avec l'introduction de la présure dans le lait et se poursuit bien après la coagulation.

Nous nous sommes attachés dans ce travail à mettre en évidence que la thrombélastographie de HARTERT (1948) pouvait être utilisée avec profit dans l'étude de la coagulation du lait non seulement pour la mesure du temps de floculation mais encore pour l'appréciation des propriétés mécaniques du coagulum, son aptitude à la synérèse, et la préparation des fabrications industrielles.

De même, la préparation des caillés acides a été développée ces dernières années tant en France qu'à l'Etranger grâce au développement des techniques nouvelles de séparation du caillé et du sérum. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la fabrication de caillés lactiques à partir de lait concentré selon le procédé français "SH 13" (Brevets SEFFAC Paris, 1964) en essayant d'éclaircir le rôle de l'eau d'hydratation des caséines dans la texture des pâtes obtenues.

B - SYNERESE DU COAGULUM.

La partie visible de la séparation du caillé et du sérum commence avec l'apparition d'un film de liquide au dessus d'un coagulum nouvellement formé. Cette exsudation de sérum, qui résulte de la synérèse du caillé en formation, autrement dit de sa contraction, se poursuit ensuite plus ou moins rapidement et intensément sous l'action de nombreux facteurs physicochimiques et se termine avec l'égouttage. Elle doit permettre finalement la réalisation d'un fromage dont la teneur en eau se rapproche le plus possible de l'humidité optimale définie pour chaque type de produit. Son importance est donc grande, d'autant plus que la teneur en eau du caillé égoutté intervient sur les stades ultérieurs de l'élaboration du fromage : salage et affinage. Cependant, cette étape visible de la séparation du caillé et du sérum n'est que la phase finale du phénomène qui débute avec l'action de l'enzyme dans le cas de fabrications de type présure (CHEESEMAN, 1962).

En ce qui concerne les fabrications de type acide, la synérèse naturelle est très limitée, il s'agit plutôt d'une exsudation sous l'influence d'actions extérieures (traitements thermiques, mécaniques ... etc). Nous essaierons de montrer que les facteurs qui interviennent sur la coagulation du lait ont également une action sur la synérèse du coagulum et l'exsudation du sérum.

C - STRUCTURE DIPOLAIRE DE L'EAU ET LIAISON HYDROGENE.

L'eau est un constituant fondamental des systèmes biologiques et des milieux dans lesquels ils évoluent non seulement parce qu'elle en est le constituant majeur mais aussi parce qu'elle intervient directement dans leur comportement physique et chimique. Ses propriétés propres sont multiples, parfois singulières ; elles ont conduit les chercheurs à attribuer des noms différents et significatifs à l'eau se trouvant dans différents états et douée d'une ou plusieurs caractéristiques particulières : eau de constitution, eau d'hydratation, eau liée. Quelque soit le nom utilisé, il désigne toujours le composé de formule brute H_2O .

Parmi ses propriétés il faut distinguer l'existence d'un moment dipolaire permanent et sa propension à établir des liaisons hydrogène.

Le moment dipolaire permanent de l'eau résulte de la géométrie de la molécule. Dans celle-ci, les orbitales 1s de deux atomes d'hydrogène et deux orbitales 2p d'un atome d'oxygène s'interpénètrent et, bien que l'angle formé par les deux liaisons covalentes O - H soit légèrement supérieur à 90° , il atteint 105° par suite de la répulsion des deux protons, l'ensemble a une structure dipolaire, les deux protons s'opposant à la charge négative développée par le nuage électronique entourant le noyau de l'atome d'oxygène. Cette polarisation favorise les associations de molécules d'eau entre elles et avec d'autres molécules polaires ou non polaires mais polarisées par induction ; elle favorise aussi la dissolution de molécules polaires dont la dissociation est favorisée par l'attraction électrostatique exercée par chaque extrémité des dipôles d'eau, action dont l'importance est précisée par la constante diélectrique élevée de ce solvant (80,37 à 20°C).

La tendance naturelle des molécules d'eau à établir des liaisons hydrogènes est également très importante pour les phénomènes d'hydratation qui nous intéressent. Ces liaisons, de nature essentiellement électrostatique, s'établissent entre un atome d'hydrogène déjà lié par covalence et un atome fortement électronégatif (F, O, N...) ; leur énergie décroît directement avec l'électronégativité des éléments et inversement avec leur rayon d'encombrement. Elles peuvent réunir des molécules entre elles, différentes ou identiques (par exemple le dimère d'acide formique), ou simplement lier des groupements d'une même molécule en lui conférant une structure définie (structure secondaire et même tertiaire des protéines). Leur énergie de liaison est relativement faible, de l'ordre de 4 à 7 K cal/môle, mais leur nombre élevé peut leur donner une importance considérable. Dans le cas de l'eau par exemple, du fait de la position des deux protons et de l'individualité des deux paires d'électrons 2s et 2p de l'atome d'oxygène, il peut s'établir quatre liaisons hydrogène par molécule. Chaque atome d'oxygène se trouve au centre d'un tétraèdre régulier dont les sommets sont occupés par un autre atome d'oxygène (SHERAGA, 1963). Cette structure est celle du cristal de glace ; elle disparaît partiellement quand la glace fond mais il reste un nombre important de liaisons hydrogène dans l'eau liquide et c'est la persistance de ces liaisons qui explique en grande partie ses propriétés (Fig.1).

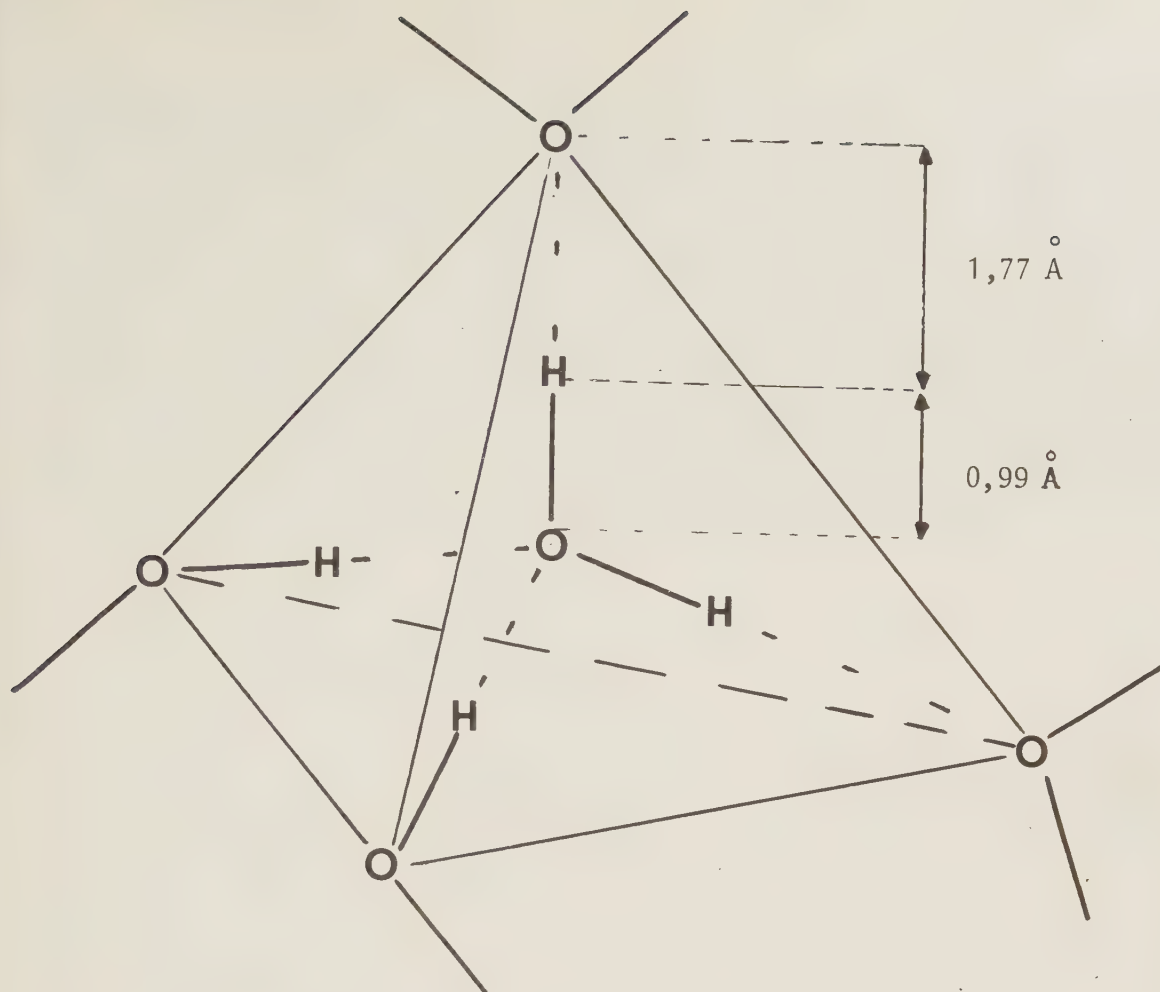


FIG.1 : Structure de la glace.

Aux températures ambiantes et même relativement élevées, comprises entre 20 et 70°, on peut observer les molécules d'eau dans l'eau pure sous plusieurs états : soit liées entre elles par quatre liaisons hydrogène, soit seulement par 3, 2 ou 1 liaison de ce type, soit entièrement libres. Si l'on met au contact de ces molécules d'eau un corps, sinon de nature dipolaire, du moins chargé électrostatiquement par l'intermédiaire de plusieurs groupements chimiques, parmi lesquels certains sont capables de former des liaisons hydrogène, il va s'entourer d'un nombre de molécules d'eau plus ou moins nombreuses et plus ou moins bien orientées et liées.

D - HYDRATATION DES PROTEINES.

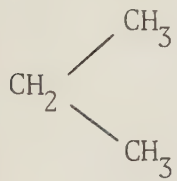
Les protéines, et en particulier les caséines, sont des substances qui sont constituées en quantités à peu près équivalentes de résidus d'acides aminés qui portent une chaîne latérale polaire (Lysine, histidine, Arginine, Tyrosine, Acide Glutamique, Acide Aspartique) capables de réagir avec les molécules du solvant, et de résidus à chaîne latérale non polaire ou se comportant comme telle (Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Proline Phénylalanine, Méthionine, Cystine, Tryptophane).

De plus, les groupes - CO - NH - des liaisons peptidiques de la structure primaire peuvent former des liaisons hydrogène qui interviennent essentiellement dans l'établissement de la structure secondaire mais qui sont aussi susceptibles d'intervenir dans la fixation de molécules d'eau.

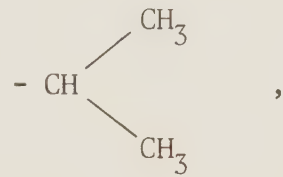
Il en résulte que les protéines sont normalement hydratées et se comportent toujours comme des molécules accompagnées d'eau et non comme de simples enchainements d'acides aminés. On sait actuellement mesurer par différentes méthodes la quantité d'eau qui se trouve ainsi retenue par la molécule protéique mais on ne connaît pas exactement tous les mécanismes qui interviennent dans cette fixation et l'on ne sait pas si cette eau est bien définie et forme une phase homogène ou si au contraire, elle est constituée par de l'eau se trouvant dans différents états et possédant des caractéristiques spécifiques.

Pour certains auteurs (KLOTZ 1958, 1959) il se formerait une couche d'eau organisée autour des chaînes latérales non polaires de la chaîne protéique. Ces chaînes latérales se comportant comme les molécules gazeuses non polai-

res (CH_4 , C_2H_2 , C_2H_6 ...) donnant des hydrates de gaz en solution aqueuse. Il existe en effet une analogie de structure entre le méthane CH_4 et la chaîne latérale $-\text{CH}_3$ de l'alanine, entre le propane



et la chaîne latérale de la valine

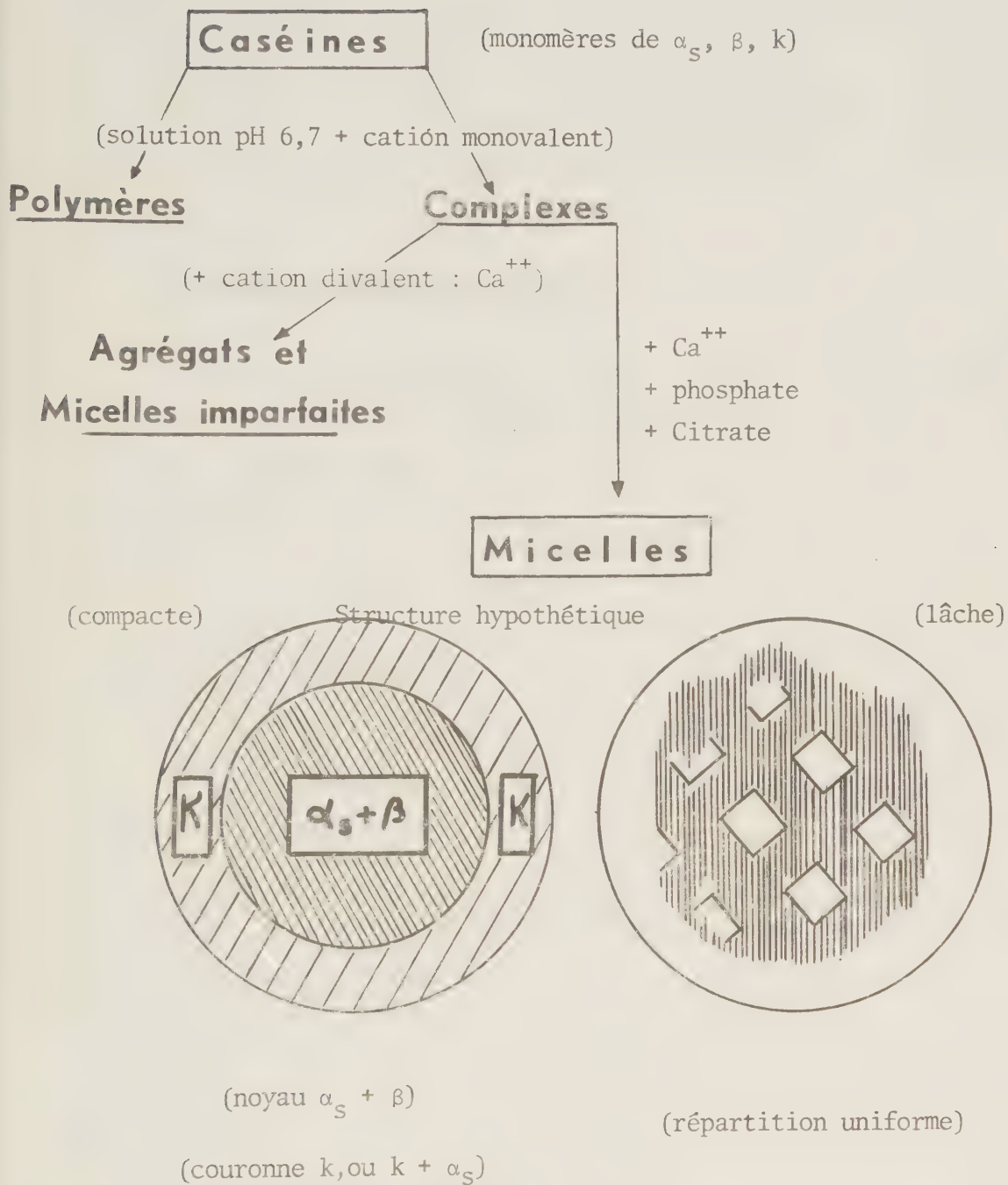


entre le méthylmercaptan $\text{CH}_3 - \text{SH}$ et la chaîne latérale de la cystéine $-\text{CH}_2 - \text{SH}$ etc ...

Cette théorie n'est plus retenue actuellement ; on préfère penser avec KAUZMANN (1954, 1959), que les groupes non polaires des chaînes latérales des résidus d'acides aminés tendent à se retourner vers l'intérieur de la molécule pour éviter la phase aqueuse, ce qui a pour effet de placer les groupes polaires à la surface de la molécule en contact direct avec l'eau. Si le nombre de résidus polaires est équivalent au nombre de résidus non polaires, comme c'est le cas pour les caséines, la protéine se présente sous forme d'une sphère compacte présentant un volume intérieur hydrophobe et une couche externe hydrophile occupée par les groupes polaires en contact plus ou moins étroit avec les molécules de solvant. S'il y avait un excès de groupes polaires la molécule aurait tendance à s'étirer, s'il y avait un excès de groupes non polaires il y aurait tendance à l'aggrégation ou à la formation d'oligomères.

Dans le lait le problème de l'hydratation des caséines est compliqué par la formation, en présence de calcium ionisé, de complexes et de micelles qui font intervenir des liaisons par forces de Van Der Waals et des liaisons hydrogène.

On ne connaît pas la structure exacte des micelles de phosphocaséinate de calcium du lait mais on sait qu'elles sont formées d'associations stoechiométriques des caséines α_s , β et K (Mc KENZIE 1967, RIBADEAU-DUMAS et coll 1969, WAUGH et coll 1970, FOX et coll 1972, ALAIS 1973) ; leur formation et leur structure hypothétique sont schématisées dans la figure 1'. Dans ces associations la caséine K doit occuper une position clé étant donné l'importance de son pouvoir stabilisant sur les autres caséines vis à vis du calcium. Le poids moléculaire des micelles est très variable, de 1 à 300×10^7 (NITSCHMANN 1949) ; elles constituent donc des édifices qui peuvent être très importants et très hydratés.



F.1' : Formation et structure hypothétique des micelles.

(d'après ALAIS - Sciences du Lait - 3e éd.1973 SEPAIC).

On peut admettre que l'espace intra moléculaire des caséines est hydrophobe, mais que l'espace intramicellaire résultant de la réunion de nombreuses molécules protéiques est au contraire hydrophile. Ce volume intramicellaire peut être important ; pour certains auteurs (RIBADEAU DUMAS 1969) il est suffisant pour permettre la pénétration de molécules de masse moléculaire au moins égale à 35 000. Il peut donc renfermer des molécules de solvant plus ou moins fortement liées à la protéine, de la même façon que l'eau liée extérieurement à la micelle. Il peut même se produire, et cela dépend de la forme physique réelle des micelles, qu'une partie de cette eau intramicellaire soit emprisonnée de manière purement mécanique.

E - EAU LIEE ET EAU D'HYDRATATION.

D'après la littérature on peut distinguer deux catégories dans l'eau qui accompagne habituellement les molécules protéiques : l' "eau liée" et l' "eau d'hydratation".

L'eau liée est définie actuellement par l'intermédiaire d'une de ses propriétés :

- résistance anormale à l'évaporation,
- absence de congélation à -18°C (0°F),
- perte de ses propriétés de solvant,
- non obéissance aux forces osmotiques dans les échanges entre les cellules et le milieu.

Dès 1922 NEWTON et GORTNER (1922) avaient suggéré l'emploi d'une méthode cryoscopique pour le dosage de l'eau liée qu'ils considéraient comme une eau incapable d'agir comme solvant. En 1932 GORTNER publie une mise au point relative aux travaux effectués sur l'eau liée. Il conclue que "l' eau n'existe pas complètement comme eau libre, telle que nous la connaissons et la manipulons, mais que, dans les édifices organiques, une plus ou moins grande partie de l'eau leur est intimement liée". Plus tard, JONES et GORTNER (1932) montrent que la quantité d'eau liée des gels de gélatine varie avec leur concentration : elle est d'autant plus grande que le gel est faiblement concentré.

En 1934, NICLOUX et GOSSELIN constatent que "si l'on plonge un poisson dans un milieu très faiblement alcoolisé, 1 à 5 %, et pendant un temps suffisamment long pour qu'un état d'équilibre soit atteint on trouve que la teneur en alcool rapportée à l'eau des tissus n'est pas égale à la teneur en alcool du milieu extérieur, elle lui est inférieure : tout se passe comme si une partie de l'eau tissulaire, 12 à 14 %, était imperméable à cette substance, pourtant extrêmement diffusible".

La même année, NICLOUX (1934), en travaillant sur le goujon, admet l'hypothèse que l'eau est liée aux protéines dans une proportion qui atteindrait environ 50 % de leur poids (les tissus du goujon ne renferment que des traces de glucides et de lipides).

Dans le lait et les produits laitiers la fixation d'eau sur les matières organiques s'accompagne de changements physiques ou chimiques du système colloïdal. D'après PYENSON et DAHLE (1938), quand cette fixation d'eau augmente, la viscosité du produit s'accroît, de même que la stabilité à l'alcool des protéines. Toujours d'après ces auteurs, la quantité d'eau liée du lait dépend de sa teneur en extrait sec et de nombreux autres facteurs : équilibre salin, acidité, état de dénaturation, etc ... Ceci a pour conséquence que deux échantillons de même extrait sec peuvent avoir des teneurs en eau liée différentes. Pour un lait normal cru (à 13,2 % d'extrait sec), la teneur en eau liée serait de 3,18 g pour 100 g de produit ; pour le lait écrémé (à 9,4% d'extrait sec), cette valeur tombe à 2,13 g pour 100 g de lait. La répartition de cette eau liée aux divers constituants du lait est la suivante d'après PYENSON et DAHLE (1938) :

Caséine	55,14 % de l'eau liée totale			
albumine	29,11 %	"	"	"
Matière grasse + membrane	11,65 %	"	"	"
Substances restantes	4,10 %	"	"	"

Pour un lait reconstitué à partir de poudre ils trouvent des teneurs en eau liée plus importantes : ainsi, un lait écrémé reconstitué à 24 % d'extrait sec contient 14,72 % d'eau liée.

En appliquant la technique cryoscopique de PYENSON et DAHLE aux fromages, ALLEMANN (1940) montre que la plus grande partie de l'eau liée est fixée par les protéines. MOCQUOT (1945 et 1947) étudie également l'eau liée des

fromages mais il utilise la méthode de NICLOUX (1934) et de Mc DOWALL et DOLBY (1936). Il montre que différents facteurs interviennent sur la fixation de l'eau par les protéines : le chauffage du lait, la pression d'égouttage, le salage. Il montre également que la nature du sucre utilisé comme "traceur" intervient grandement : la teneur en eau liée augmente avec le nombre d'atomes de carbone ; on ne peut donc pas définir une seule eau liée.

En partant de ces résultats et de résultats personnels nous avons émis l'hypothèse que l'eau liée pourrait être constituée par la couche de molécules d'eau adjacente aux molécules protéiques, qu'elle soit intra ou extra micellaire. Ces molécules seraient parfaitement orientées et liées à la protéine par des liaisons dont le type principal serait la liaison hydrogène. Entre cette couche d'eau liée et l'eau libre, dont les molécules sont indépendantes (ou, en tout cas, n'ont pas de liaison avec la protéine ou les molécules d'eau liées), il existe une zone intermédiaire où les molécules d'eau sont de moins en moins reliées à la protéine par la couche précédente et de moins en moins orientées. Cette liaison peut être réalisée de manière purement électrostatique ou par l'intermédiaire de 3, 2 ou 1 liaison hydrogène. L'ensemble de l'eau liée et de cette couche intermédiaire constituerait l' "eau d'hydratation" de la molécule ou de la micelle de caséine.

Dans notre étude de l'hydratation des caséines nous avons employé à la fois l'ultracentrifugation et la cryoscopie. Nous verrons dans quelles conditions on peut utiliser ces deux techniques avant d'étudier l'hydratation des micelles de caséine en fonction de leur densité. On sait en effet, après les travaux de NITSCHMANN (1949), de HOSTETTLER et IMHOFF (1952), de WAUGH (1961), de BOHREN et WENNER (1961) et de SCHMIDT (1965) par exemple, que le diamètre des micelles est assez variable. Si, dans un lait normal, la plus grande partie d'entre elles a un diamètre voisin de 100 nm, une partie non négligeable a un diamètre nettement supérieur, jusqu'à 300 nm, et une autre partie au diamètre très inférieur, de l'ordre de quelques dizaines de nm. On sait aussi que la concentration du lait par évaporation d'eau est un processus technologique favorable à l'augmentation de taille des micelles ou à la formation d'agrégats (HOSTETTLER et coll 1951, 1953). Il est donc intéressant de savoir si, dans un tel lait, les grosses micelles diffèrent en composition ou en hydratation des plus petites, ou des micelles de même taille d'un lait normal, différences qui pourraient influencer sur la coagulation du lait.

Nous comparerons enfin les variations de l'eau liée et de l'eau d'hydratation en fonction de la teneur du lait en matière sèche, en calcium, en phosphate colloïdal, de son pH et de différents traitements thermiques. Au cours de la discussion nous essayerons de préciser ce qu'il faut entendre par eau "liée" et eau d' "hydratation".

Nota Bene.

1) Des résultats partiels ont été précédemment publiés :

- Etude thrombélastographique de la coagulation du lait par la présure : action de la température et de la concentration en calcium.

TARODO de la FUENTE B., FRENTZ R.,
Le Lait (1966) n° 457 p.371.

- Etude de la coagulation du lait par la présure et de la synérèse du coagulum par la méthode thrombélastographique.

TARODO de la FUENTE B., ALAIS C., FRENTZ R.,
Le Lait (1969) n° 487 p.400.

- Effects of milk concentration on the salts equilibria and on the composition and properties of lactic curds

ALAIS C., TARODO de la FUENTE B., Milchwissenschaft
25 (1970) p.515.

- Influence du procédé de maturation sur les propriétés et la composition des caillés lactiques obtenus par coagulation du lait concentré.

TARODO de la FUENTE B., TURK S., ALAIS C., HUTIN G.,
BRUNEAU J.C., Le Lait (1971) n° 509 - 510 p.623.

2) Les essais sur les caillés acides obtenus par le procédé "SH 13" ont été réalisés en collaboration avec le Service de Recherche des Etablissements J.HUTIN de Blaise sous Arzillieres, dirigés par Monsieur HUTIN Gérard, Président Directeur Général Adjoint.

II - MATERIEL ET METHODES

A - LAITS.

1 - NORMAL - Le lait utilisé est soit du lait entier ou écrémé de grand mélange, soit du lait reconstitué à partir d'une poudre obtenue par le procédé SPRAY*, et n'ayant subi qu'un traitement thermique modéré.

2 - CONCENTRE - Le lait concentré est obtenu par évaporation d'eau sous un vide supérieur à 750 mm de mercure à une température inférieure ou égale à 55°C. Dans ce cas la teneur en matière sèche dégraissée du lait a été amenée à 195 g par kg ce qui correspond à une concentration de 2,5 fois.

Dans d'autres cas le lait concentré a été obtenu par dissolution d'une quantité de poudre déterminée pour conduire à des teneurs en matière sèche comprises entre 70 et 260 g par kg.

3 - PRIVE DE PHOSPHATE COLLOIDAL.

Ce lait est préparé selon la technique de PYNE et Mc GANN (1960). Un volume de lait refroidi à 0° est acidifié par 0,35 ml, pour 100 ml, d'acide chlorhydrique pur, et dialysé à la même température pendant 96 h contre vingt volumes du même lait changés toutes les 24 heures.

4 - PASTEURISE.

La pasteurisation est réalisée à la température désirée en faisant passer le lait dans un serpentin en verre plongé dans un bain marie. Le temps de chauffage est déterminé par la longueur du serpentin et son débit. A la sortie de la section de chauffage le lait circule dans un serpentin de refroidissement et il sort à la température de 20 - 22°C.

* Nous remercions les Etablissements LESAFFRE, Cérences, pour la fourniture gracieuse de lait sec. Le même stock, conservé hermétiquement clos, à l'abri de la lumière dans un local sec, a servi à toutes les expériences.

B - MESURE DU TEMPS DE FLOCCULATION.

La mesure du temps de floculation du lait par la présure peut être effectuée par des méthodes variées. Les plus simples et les plus conventionnelles consistent à observer un film du lait emprésuré s'écoulant sur les parois d'un récipient en verre (SOMMER et MATSEN 1935, BERRIDGE 1952, BERRIDGE 1952) ou le déplacement du même lait dans un tube capillaire (TARODO et FRENTZ 1966, SCOTT BLAIR et BURNETT 1963). Parmi ces méthodes, celle qui nous semble le mieux adaptée est celle de SOMMER et MATSEN (1935) et c'est celle que nous avons utilisée.

Le lait, porté à la température de l'analyse dans un bain marie est versé rapidement dans un tube en verre pyrex de 32 mm de diamètre également plongé dans un bain marie à la même température et contenant la quantité de présure voulue. Ce tube est alors animé d'un lent mouvement de rotation autour de son axe incliné à 30° par rapport à la surface du bain marie et immergé de façon telle que le niveau du lait soit au dessous du niveau de l'eau. L'observation du film de lait qui apparaît sur la partie supérieure du tube par suite de sa rotation permet de déterminer le temps de floculation avec une bonne précision. On voit en effet très nettement ce film de lait se fragmenter en une infinité de punctuations au moment de la floculation.

C - MESURE DE LA COAGULATION PAR THROMBELASTOGRAPHIE.

Les méthodes précédentes font largement appel à l'expérience de l'opérateur et elles se prêtent mal à l'automatisation. Des tentatives ont été faites pour rendre plus rapide et automatique la mesure du temps de floculation, notamment celles de DE MAN et BATRA (1964) qui ont utilisé un appareil employé en hématologie (Clot timer, MECHROLAB).

Des méthodes faisant appel à des instruments plus compliqués permettent de suivre en continu une partie du phénomène de la coagulation. En dehors de la spectrophotométrie utilisée par CLAEISSON et NITSCHMANN (1957), les méthodes les plus intéressantes, en considérant les aspects pratiques du problème, sont basées sur les variations de viscosité et d'autres propriétés rhéologiques.

Ainsi, dès 1932, CHRISTEN et VIRASORO, se basant sur la constatation que l'apparition des flocons correspondait à une brusque augmentation de viscosité, ont apprécié le temps de floculation de laits emprésurés par le viscosimètre électromagnétique de BERRAZ. En 1963, BURNETT et SCOTT BLAIR (1963) ont décrit un "torsiomètre" permettant de suivre la coagulation du lait par la présure, appareil qui a été perfectionné par la suite (PLINT, BURNETT et SCOTT BLAIR 1967).

Plus tard, JACQUET et MARCAIS (1964), ont utilisé le "Thrombélostraphé" pour mesurer les temps de coagulation du lait et suivre l'évolution des propriétés mécaniques des caillés ; il s'agissait de l'appareil original d'après HARTERT (1948), conçu pour l'étude de la coagulation du sang.

Par la suite, en collaboration avec FRENTZ (TARODO de la FUENTE et FRENTZ 1966), nous avons utilisé cet appareil sous sa forme modifiée d'après les indications de FRENTZ (1965) afin de le rendre apte à l'étude de caillés de type "adynamique", comme celui que forme le lait. L'appareil ainsi modifié a été dénommé "Lactodynamographe" et utilisé également par THOMASOW (1968).

Plus récemment, une autre méthode, basée sur la mesure des dimensions des particules dans le lait emprésuré grâce à un compteur électronique, (COULTER COUNTER) a été développée par GUTHY et KIERMEIER (1971, 1972).

Dans nos expériences nous avons utilisé un Thrombélastographe HELLIGE* dont la fig.2 donne une vue d'ensemble et la fig.3 le schéma de principe.

L'appareil est constitué de trois unités de mesure de sensibilités différentes et d'un système photographique permettant l'enregistrement continu du phénomène de la coagulation. Nous avons toujours utilisé l'unité de mesure la plus sensible afin d'avoir la meilleure précision possible. Chaque unité est constituée par une cuve de mesure cylindrique, en acier inoxydable, de 8 mm de diamètre intérieur et de 12 mm de profondeur. Cette cuve peut être rendue solidaire d'un système d'entraînement qui lui communique un mouvement d'oscillation périodique autour de son axe vertical ; l'amplitude du mouvement est de $4^{\circ}45$ et sa période de 16 sec. compte tenu d'un arrêt de 1 sec. à chaque extrémité.

* HELLIGE - FRANCE 80, Rte de BISCHWILLER (67) STRASBOURG-SCHILTIGHEIM.

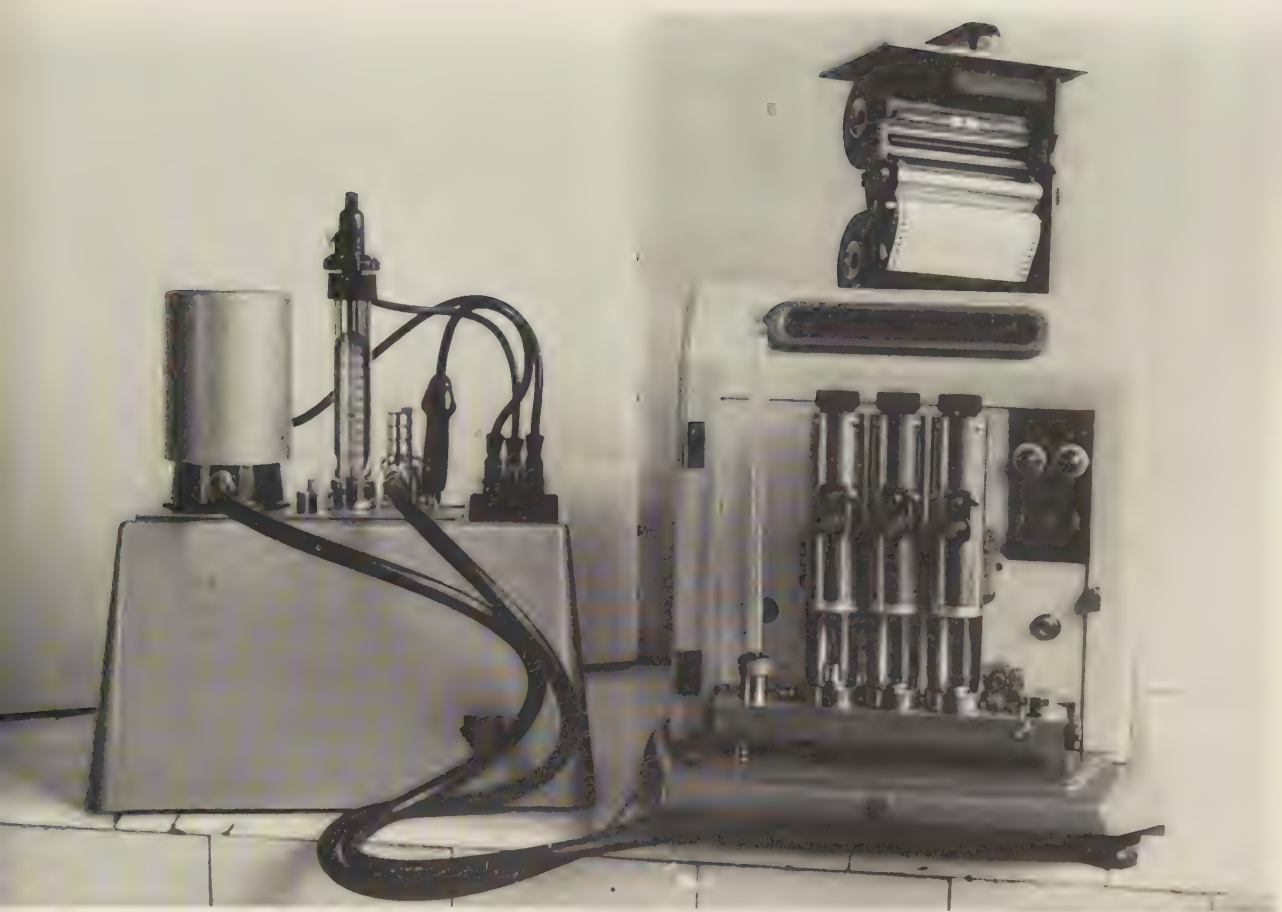


FIG.2 : Thrombélastographe HELLIGE avec thermostat à circulation HAAKE.

Dans cette cuve peut être abaissé un cylindre plongeur suspendu à un fil de torsion (fig.3). Ce fil porte un miroir capable de réfléchir un spot lumineux sur une échelle graduée visible de l'opérateur et sur un papier photographique qui se déroule à la vitesse constante de 2 mm par mn. La sensibilité de ce papier est telle qu'il ne peut être impressionné que pendant l'arrêt de 1 sec. observé par la cuve et le spot lumineux à chaque point extrême de leur déplacement. Contrairement à ce qui a lieu dans les thrombélastographes destinés à l'étude de la coagulation sanguine, la température de la mesure est ici variable grâce à un thermostat à circulation permettant d'envoyer un courant d'eau chaude dans la plaque de fondation qui entoure les cuves de mesure. La température du liquide contenu dans la cuve peut être ainsi réglée à la valeur désirée au dixième de degré près.

Tant que le lait emprésuré que l'on a mis dans la cuve reste liquide, les oscillations de cette dernière ne sont pas transmises au cylindre plongeur et le miroir réfléchit sur le papier photographique un spot lumineux immobile. Cela se traduit sur l'enregistrement par l'inscription d'une ligne droite (fig.4).

Dès que la floculation du lait a lieu, le gel en formation crée une liaison entre la cuve et le cylindre plongeur qui est de plus en plus entraîné. Le spot lumineux balaye le papier photographique mais il ne l'impressionne suffisamment que pendant la seconde d'arrêt correspondant à chaque position extrême. Sur l'enregistrement on observe alors un dédoublement du tracé et l'écartement de ses deux branches est fonction de la force de la liaison cuve-cylindre plongeur, donc des propriétés mécaniques du coagulum.

- Le temps de floculation thrombélastographique "r" correspond au temps écoulé entre l'emprésurage et le début du dédoublement du tracé.

- Le paramètre "k" est le temps mis par le coagulum pour acquérir certaines propriétés mécaniques définies par une largeur du tracé de 20 mm. Il représente la vitesse avec laquelle se forme et se raffermi le coagulum.

- Le paramètre "Am" mesure l'écartement maximal des deux branches du thrombélastogramme, il correspond donc à la fermeté maximale atteinte par le coagulum avant le début de l'exsudation du sérum. En effet, dès que la synérèse du coagulum se produit, la contraction du gel entraîne l'apparition d'un film de sérum entre le coagulum et les parois de la cuve, ce qui a pour effet d'affaiblir la liaison cuve-cylindre plongeur. A partir de cet instant

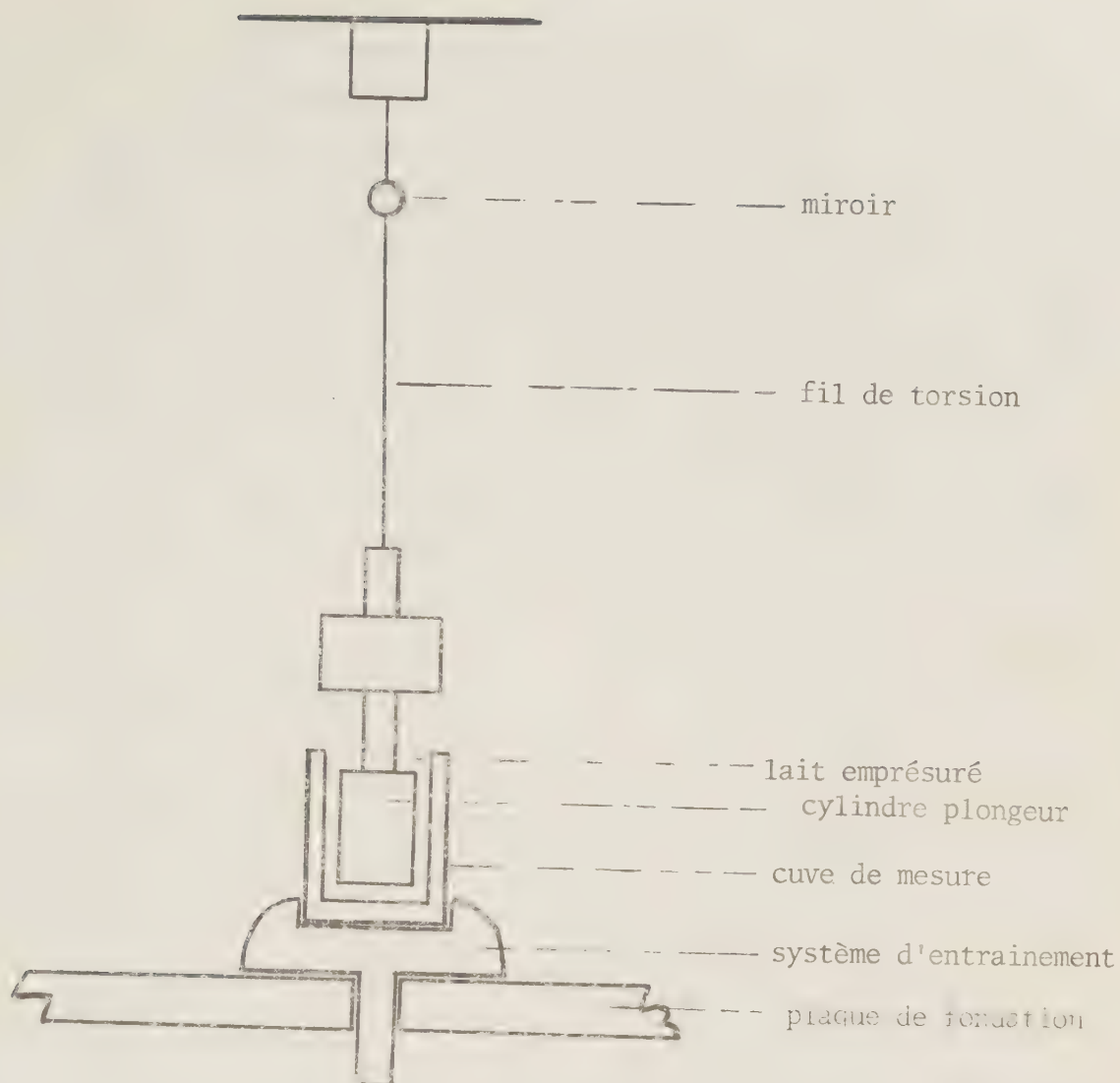


FIG.3 : Schéma de principe d'une unité de mesure.

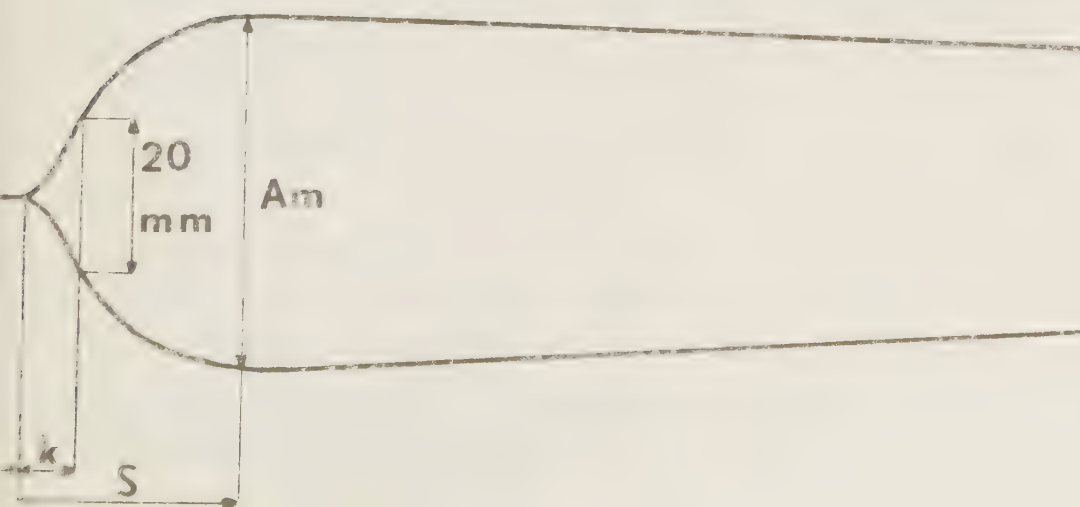


FIG.4 : Thrombélástogramme.

les branches du tracé se resserent pour finalement se rejoindre lorsque l'exsudation est suffisamment avancée. Le tracé constitue alors une représentation de la rétraction du coagulum (fig.5).

- Le paramètre "S" représente le temps compris entre le début de la coagulation et le moment où le tracé thrombélastographique a atteint son amplitude maximale "Am" et commence à se rétracter. Quand les essais sont de longue durée on recouvre le gel en formation d'huile de vaseline pour éviter que la formation d'une "peau" en surface gêne l'enregistrement. Dans tous les essais de coagulation on a utilisé une solution de présure contenant 0,75 g d'enzyme en poudre du commerce au 1/100 000, dans 100 ml de tampon phosphate 0,025 M à pH 6,63, après filtration sur verre fritté.

D - MESURE DE LA SYNERESE.

L'étude de l'égouttage d'un caillé en laboratoire et plus encore en usine est un problème difficile, qui n'a reçu que quelques solutions satisfaisantes et souvent de portée limitée. On peut l'aborder de deux façons : ou bien mesurer la quantité de sérum égoutté, ou bien tenter d'apprécier la synérèse du caillé en faisant l'hypothèse que ce phénomène est intimement lié à la séparation du caillé et du sérum et qu'il peut la représenter valablement. Les difficultés majeures de la mesure viennent du nombre élevé des facteurs physicochimiques qui peuvent agir sur le déroulement de l'exsudation et de l'extrême sensibilité du caillé aux agents mécaniques. Par exemple, LAWRENCE (1959) a montré qu'un caillé qui reste plongé dans son sérum s'égoutte beaucoup plus lentement que si ce sérum est éliminé au fur et à mesure de son apparition.

Parmi les techniques qui mesurent la quantité de sérum exsudé on peut citer celle de BEEBY (1959) ; le lait est coagulé par la présure dans un récipient en acier inoxydable. Deux à trois minutes après la coagulation on ajoute au dessus du caillé et délicatement pour ne pas provoquer la synérèse, 100 ml de "traceur" constitué par du lait écrémé rendu incoagulable par addition de formol. Le caillé est alors tranché et on prélève à intervalles réguliers une fraction du mélange traceur plus sérum que l'on passe au colorimètre. La dilution du traceur par le sérum permet de tracer une courbe représentant l'exsudation. PULAY, CSOK et BAKOS (1971) ont utilisé une technique du même

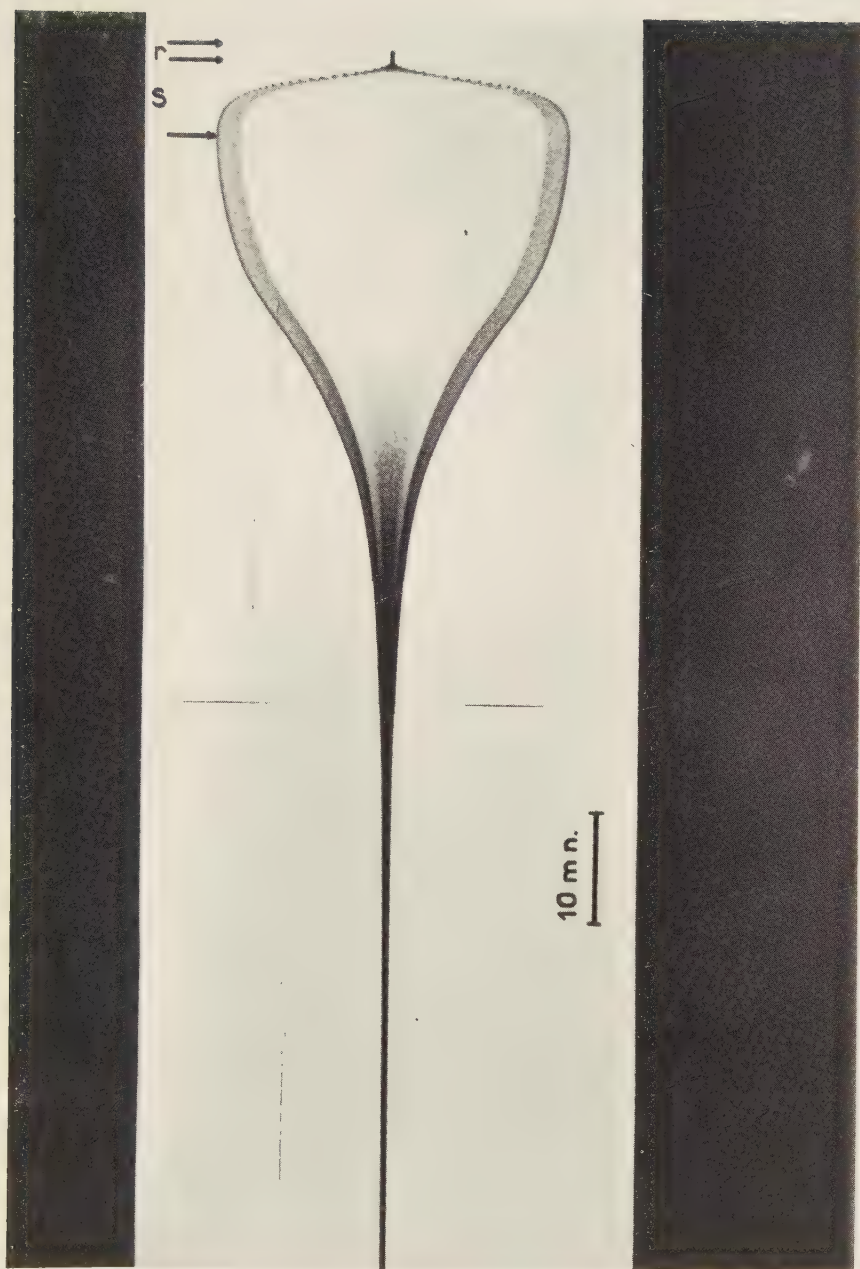


FIG.5a: Diagramme thrombélastrographique montrant la rétraction du tracé correspondant à la synérese.

genre ; nous avons utilisé une technique volumétrique (TARODO, ALAIS et FRENTZ (1969) dans laquelle le lait est emprésuré dans un tube en cuivre thermostaté de gros diamètre (40 mm). Ce matériau évite l'adhérence du coagulum aux parois, contrairement au verre et à l'acier inoxydable. Le tube est percé d'un orifice à sa partie inférieure ; il est muni d'un tamis, formant bouchon, qui permet de soulever le caillé au temps "S" sans le briser ; dès ce moment, le sérum s'écoule librement dans un collecteur de fractions. On peut ainsi tracer la courbe traduisant la vitesse d'exsudation du sérum.

Il n'y a qu'une technique, à notre connaissance, qui permette de mesurer la rétraction du coagulum : c'est la méthode thrombélastographique dont nous avons déjà parlé.

Dans la pratique industrielle, un appareil de fabrication anglaise, la "Pitching balance" de SCOTT BLAIR et COPPEN (1940), permet de suivre l'égouttage de fromages du type Cheddar ou Gruyère. Grâce à un tamis spécial on prélève un certain volume de grains de caillé. Après un égouttage de 30 sec. on dépose le gateau de caillé formé sur le plateau de la balance qui donne directement la valeur du rapport poids de caillé/hauteur du gateau de caillé. Le rapport diminue avec l'assèchement des grains de caillé. La détermination de cette "densité apparente" permet de suivre correctement l'évolution des propriétés du caillé pendant le brassage et la cuisson (MOCQUOT et col. 1947).

E - MESURE DE LA FERMETÉ DES CAILLES.

Le thrombélastographe permet de suivre l'évolution de la fermeté du coagulum depuis la floculation du lait jusqu'au moment où la synérèse est suffisamment avancée pour annuler la liaison cuve-cylindre plongeur. Il ne peut nous donner aucune indication sur le caillé égoutté. Nous avons utilisé pour cela le Pénétromètre automatique AP 4/1 (VEB FEINMESS, DRESDEN) avec le corps plongeant décrit par SCHALINATUS et BEHNKE (1969) pour la mesure dans les gels mous. Cet appareil permet de mesurer rapidement le degré de pénétration en n secondes d'un corps de forme, de dimensions et de masse données dans une substance maintenue à une température constante. On obtient par lecture directe le nombre de 1/10 de mm dont le corps de pénétration s'est enfoncé. Par commodité nous avons utilisé l'expression "indice

de fermeté" (IF), égale au rapport 1000/nb de 1/10 de mm d'enfoncement.

F - PREPARATION DES CAILLES ACIDES.

Les deux méthodes de production utilisées correspondent aux schémas suivants :

<u>Méthode classique</u>	<u>Méthode continue (Paracurd)</u>
Ecrémage	Ecrémage
Pasteurisation	Pasteurisation
-	Concentration (2,5 : 1)
Ensemencement (3 %)	Ensemencement (15 %)
Emprésurage	-
Maturation (24 h à 20°C) et coagulation*	Maturation (15 h à 20°C) -
-	Refroidissement à 6 - 10°C
-	Coagulation continue par dilution à 40°C***
-	
Egouttage	Séparation continue du sérum
Lissage	Lissage ou homogénéisation.

* Le taux de matière sèche du lait à la coagulation est voisin de 9 %.

*** Le taux de matière sèche du lait à la coagulation est voisin de 10-11 %.

Le deuxième schéma correspond à la technique SH (STENNE-HUTIN) de fabrication à partir de lait concentré. Déjà utilisée pour des fromages de type présure ou mixte (HUTIN et STENNE 1964, ARDEBILI et col 1964 , N. 1965 ALAIS et STENNE 1965, MAUBOIS et coll. 1965, TOURNEUR et col. 1967, Brevet SEFFAC 1964), cette technique peut être employée pour la fabrication de pâtes fraîches.

Le lait concentré est mûré jusqu'à un pH de 4,9 environ, sans que l'on observe une précipitation irréversible des matières protéiques, et immédiatement refroidi à une température comprise entre 6 et 10°. La coagulation a lieu dans une machine spéciale dénommée "PARACURD" où le lait est mélangé à de l'eau chaude dans le double but d'amener son taux de matière sèche près de 11 % d'une part, et de le réchauffer suffisamment pour que la caséine puisse précipiter d'autre part. Cette précipitation est pratiquement instantanée et suivie d'une synérèse et d'un durcissement des fragments de caillé pendant leur progression dans un tube spécial (fig.6). Le sérum est ensuite séparé du caillé dans un tamis rotatif.

G - DOSAGE DES ELEMENTS MINERAUX.

1 - CALCIUM ET MAGNESIUM TOTAUX ET SOLUBLES.

Le calcium et le magnésium totaux et solubles ont été déterminés par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode que nous avons étudiée et que nous décrirons dans la troisième partie.

2 - CALCIUM IONIQUE.

Le calcium ionique a été dosé dans les ultrafiltrats de lait (Ultrafiltration à travers des boyaux cellulose ou des membranes Diaflo-Amicon) par la méthode de SMEETS (1952), modifiée par SEEKLES et SMEETS (1954) puis par SAINCLIVIER (1959). Le dosage est basé sur un indicateur spécifique du calcium : le murexide ou purpurate de potassium. On mesure l'intensité de la coloration obtenue avec des solutions étalons de calcium et des solutions de concentration inconnue.

3 - PHOSPHORE.

Le phosphore a été déterminé par la méthode de FISKE et SUBBAROW modifiée par BAMMAN et coll. (1948) après minéralisation par voie sèche sans acétate de magnésium à une température comprise entre 500 et 550°C (PIEN 1969).

Les cendres obtenues à partir de 1 g de lait sont reprises par la quantité minimale d'acide sulfurique et la solution est amenée à 50 ml avec de l'eau distillée. Le dosage est conduit comme l'indique le tableau 1. La coloration

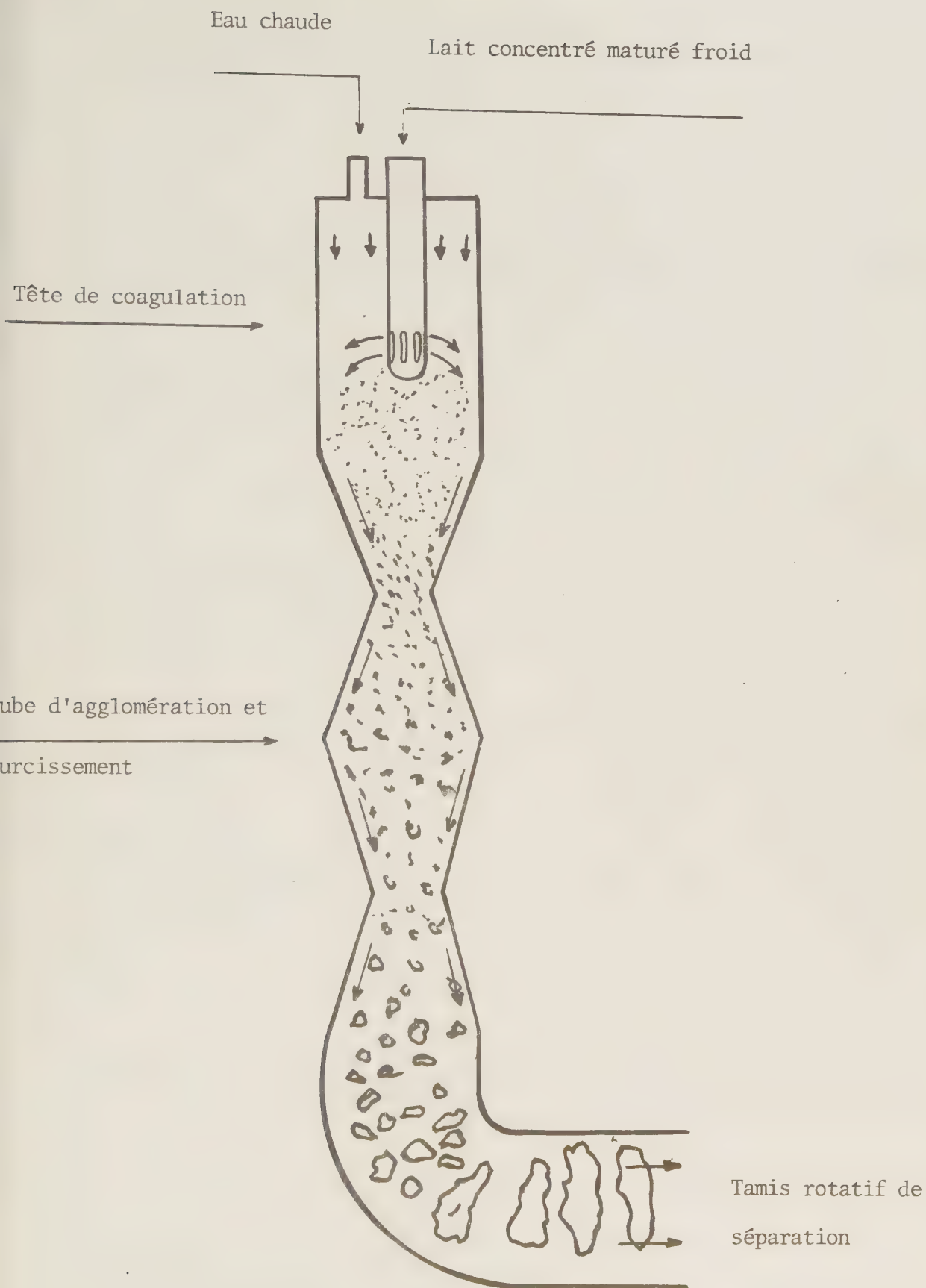


FIG.6 : Tête de coagulation et tube d'agglomération et durcissement de la PARACURD.

bleue obtenue par formation du phospho molybdate d'Ammonium est mesurée à 650 nm.

Solution étalon de	n°	1	2	3	4	5	6	7	
Phosphore à 10 mg/l	ml	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4	3	
Solution minéralisée	n°								X
inconnue	ml								1
H ₂ SO ₄ 10 N	ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Solution à 2,5 % de molybdate d'ammonium (NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ , 4 H ₂ O	ml	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Solution réductrice *	ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Eau distillée	q. s. p.	5ml de solution (A)							
Concentrations obtenues en mg de phosphore par 1 de solution A		0,8	1,6	2,4	3,2	4	4,8	6	X'

* Solution réductrice : 0,5 g d'acide 1-amino 2-hydroxy naphtalène sulfonique-4 (C₁₀ M₉ N O₄ S)

195 ml de bisulfite de sodium à 15 % (NaHSO₃)

5 ml de sulfite de sodium à 20 % (Na₂SO₃)

H - COURBES DE NEUTRALISATION ET DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE APPARENT DES LAITS.

Les courbes de neutralisation et le point isoélectrique apparent des laits normaux et concentrés ont été étudiés par la technique de BALWANT RAI PURI et coll. (1968).

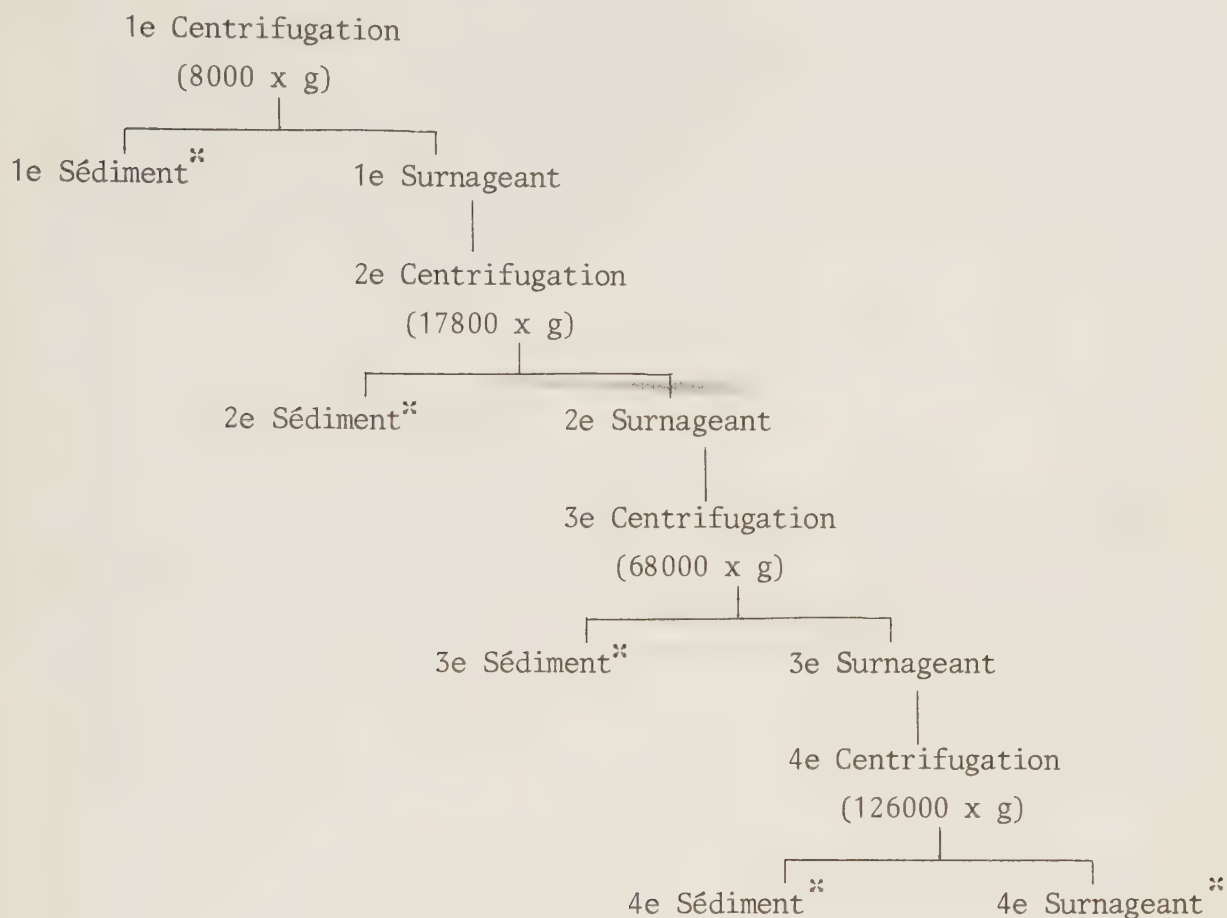
Des fractions de 10 ml de lait sont pipetées dans des flacons en pyrex contenant un volume v ml de chlorure de sodium 0,1 N et un volume $(50 - v)$ ml de soude 0,1 N ou d'acide chlorhydrique 0,1 N. Le pH de ces solutions est mesuré après 24 h de conservation à température ambiante.

Pour la détermination du pH isoélectrique les solutions dont le pH est compris entre 2,2 et 7,7 sont filtrées et l'azote est dosé sur le filtrat par la méthode de Kjeldahl.

I - FRACTIONNEMENT DU PHOSPHOCASEINATE PAR ULTRACENTRIFUGATION.

Pour mettre en évidence les différences de composition et d'hydratation entre les micelles de différents laits nous avons opéré comme l'indique le schéma suivant :

Laits écrémés reconstitués à
9,15 et 22,07 % de matière sèche



** substances analysées.

J - DOSAGE DE L'EAU D'HYDRATATION.

L'eau d'hydratation déterminée par la technique de THOMPSON et coll (1969) désigne l'eau contenue dans le sédiment de protéines formé dans un champ centrifuge de 68000 x g, pendant 35 mn à 37°C, après égouttage du sédiment pendant 5 mn (Ultracentrifugeuse SPINCO L2, Rotor type 50).

Le protocole analytique est simple. On centrifuge un poids de lait p, voisin de 10 g ; après centrifugation on découpe le tube de nitrate de cellulose

pour ne garder que la partie contenant le sédiment et on l'égoutte pendant 5 mn au dessus d'un tamis ou d'un papier filtre. On note le poids du tube égoutté p_1 , puis le poids après lyophilisation pendant 20 h : p_2 . La différence $p_1 - p_2$ correspond à l'eau d'hydratation. On pèse ensuite le fragment de tube vidé du sédiment, nettoyé et séché : p_3 . La différence $p_2 - p_3$ donne le sédiment sec qui est dissout pour analyse dans une solution diluée de soude ou dans le tampon utilisé pour les électrophorèses en gel d'amidon.

K - DOSAGE DE L'EAU LIEE.

Nous avons utilisé la méthode cryoscopique mise au point par NEWTON et GORTNER (1922) et appliquée au lait et aux produits laitiers par PYENSON et DAHLE (1938) ; elle est basée sur la propriété de l'eau liée de ne pas dissoudre les substances normalement hydrosolubles. La technique correspondante est théoriquement facile à mettre en oeuvre puisqu'elle ne nécessite que des pesées et la mesure de plusieurs abaisséments cryoscopiques ; en pratique elle est rendue très délicate par l'influence d'un grand nombre de paramètres sur les résultats. Son principe est simple.

Quand on dissout un poids x de saccharose dans un poids P de lait contenant 100 g d'eau totale, l'abaissement du point de congélation de la solution obtenue devrait théoriquement être égal à la somme : abaissement cryoscopique du lait (Δl) + abaissement cryoscopique d'une solution contenant x g de sucre dans 100 g d'eau (Δsu). En réalité, l'abaissement cryoscopique mesuré ($\Delta su + l$) est toujours supérieur à la somme ($\Delta su + \Delta l$). Cela signifie que le saccharose ajouté n'est pas dissout dans l'eau totale du lait mais seulement dans une partie E , la différence $100 - E$ représentant l'eau qui ne joue pas le rôle de solvant pour ce sucre, c'est à dire l'eau "liée" aux matières protéiques du milieu.

La technique opératoire repose sur la détermination précise des différents abaisséments cryoscopiques grâce à un cryoscope de type HORVET (ELSDON et STUBBS 1934), (STUBBS 1935) ou mieux, un cryoscope semi automatique du type ADVANCED. Dans le premier cas on utilise la technique AOAC (1965), dans le deuxième celle décrite par (ABELE 1963, OWADES et HARRIS 1964, ABELE 1965, HENNINGSON 1968, DILLIER-ZULAUF et DOYOTTE 1971).

1 - TECHNIQUE DE L' "ASSOCIATION OF AGRICULTURAL CHEMISTS".

Nous avons utilisé un bain réfrigéré à eau glycolée et un thermomètre à 0 variable du type BECKMANN, gradué en centièmes de degrés. La solution sous analyse est homogénéisée par un agitateur électrique permettant une agitation de haut en bas au rythme de 1 coup toutes les 1 ou 2 secondes. Cette agitation est maintenue jusqu'à la cessation de la surfusion provoquée par ensemencement par un petit cristal de glace. Pendant tout le temps nécessaire à la remontée du mercure du thermomètre l'agitation est interrompue ; quand le mercure approche de son point le plus haut on agite trois fois avant de faire une première lecture en tapotant le thermomètre. 30 secondes et 1 minute après on répète l'opération dans les mêmes conditions. La différence entre la première et la deuxième lecture ne doit pas dépasser $0,01^{\circ}\text{C}$; la différence entre la deuxième et la troisième lecture doit être sensiblement nulle. Dans le cas contraire on ne tient pas compte des résultats.

Dans cette technique on maintient l'agitation constante d'un essai à l'autre et on s'arrange pour que la surfusion soit toujours de l'ordre de 1°C .

2 - TECHNIQUE UTILISANT UN CRYOSCOPE SEMI-AUTOMATIQUE.

Nous avons utilisé un cryoscope ADVANCED modèle 3 R, HI - PRECISION RESEARCH, produit par la firme ADVANCED INSTRUMENTS, INC, NEWTON HIGHLANDS, MASSACHUSETTS. Cet appareil permet de mesurer le millièmes de degré centigrade et de déterminer l'abaissement cryoscopique d'une solution dans un temps moyen voisin de 3 mn. Cette rapidité d'exécution d'une mesure permet de les multiplier facilement et d'obtenir ainsi des résultats beaucoup plus proches de la réalité.

En pratique on utilise des tubes calibrés dans lesquels on pipette 2,5 ml de chaque solution d'étalonnage ou de chaque lait et solution inconnus. On maintient le tube plongé dans le bain réfrigérant dont la température est inférieure de 6 à 7° environ au point de congélation à mesurer jusqu'à ce que la température de l'échantillon, mesurée par une thermistance, dépasse ce point de congélation et indique que le solvant est en surfusion (partie A de la courbe de la fig.7). Le refroidissement est rapide au début puis ralenti en sortant progressivement le tube du

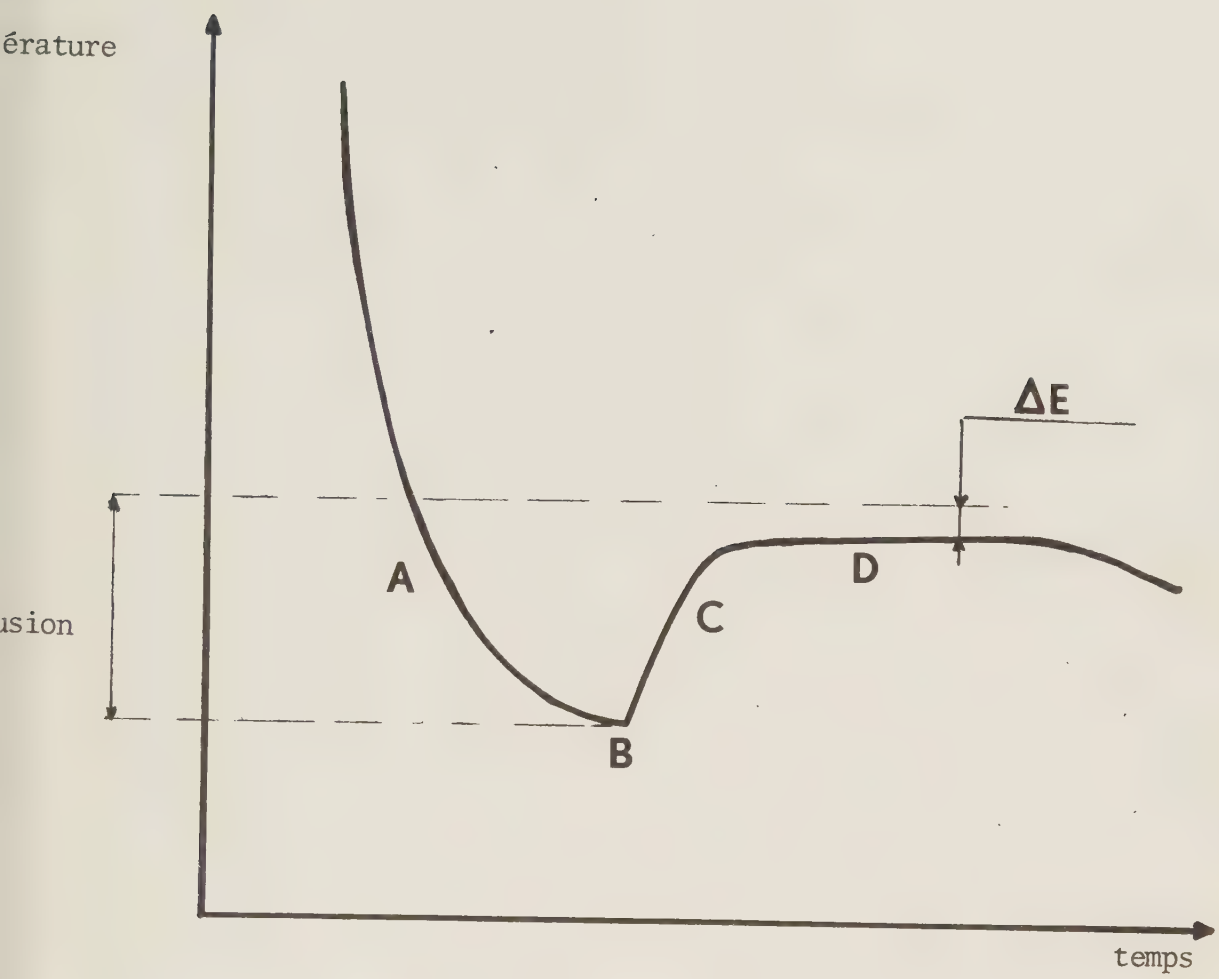


FIG.7 : Courbe de congélation d'une solution.

bain réfrigéré, de façon à ce que la température de l'échantillon soit parfaitement homogène au moment où l'on provoquera la cristallisation. Dans le même but et pendant tout son refroidissement l'échantillon est agité par un vibreur placé le plus près possible de la thermistance.

Lorsque la fusion a atteint la valeur prescrite (point B de la courbe), qui doit être la même pour tous les échantillons, on provoque une vibration violente qui la fait cesser. Si la surfusion n'était pas la même pour tous les essais, on mesurerait le point de congélation d'une solution différemment concentrée suivant la quantité de solvant congelée. La différence mesurée entre les abaissements cryoscopiques de deux solutions (lait et lait plus sucre par exemple) serait alors entachée d'une erreur importante du fait de la variabilité du facteur ΔE (fig.7), différence entre le point de congélation théorique et le point de congélation mesuré qui lui est toujours inférieur. La chaleur dégagée par la congélation d'une certaine quantité de solvant (quantité qui est fonction de l'importance de la surfusion et de la chaleur latente de fusion du solvant), entraîne l'élévation rapide de la température de l'échantillon (partie C de la courbe), jusqu'à une valeur maximale correspondant au plateau représenté par la partie D de la courbe (fig.7). Dès la cessation de la surfusion on sort complètement le tube du bain réfrigéré de façon à ce qu'il soit juste au dessus, pour rendre négligeables les pertes de chaleur qui peuvent se produire dans le sens échantillon → bain réfrigéré. Ce but est facilement atteint du fait que le solvant congelé se trouve à la périphérie du tube qui est la partie la plus froide, et constitue un étui de glace qui isole le centre de l'échantillon du bain froid. La température du plateau D correspond au point de congélation cherché.

3 - CALCUL DE L'EAU LIEE.

Le point de départ du calcul est la formule classique donnée par VAN T' HOFF en 1886 :

$$\frac{\Delta}{ms} = \frac{Mo \cdot R \cdot Ro^2}{Lo}$$

dans laquelle Δ est l'abaissement de la température de congélation du sol-

vant, T_0 la température de congélation du solvant pur en °K, R la constante des gaz parfaits, M_0 la masse moléculaire du solvant, L_0 la chaleur latente de passage du solvant d'une phase à l'autre et m_s la molalité du soluté. Elle dérive de la loi de variation de la composition d'une solution en fonction de la température

$$\frac{\partial \log x_0 \gamma_0}{\partial T} = \frac{L_0}{R \cdot T^2}$$

où x_0 est la fraction molaire du solvant et γ_0 son coefficient d'activité. En intégrant de la température de congélation du solvant pur : T_0 , à la température de congélation de la solution considérée il vient :

$$\log x_0 \gamma_0 = \int_{T_0}^T \frac{L_0}{R \cdot T^2} dT$$

Si l'on suppose que la chaleur latente de passage du solvant d'une phase à l'autre est indépendante de la température on peut écrire en première approximation

$$\log x_0 \gamma_0 = \frac{L_0}{R} \int_{T_0}^T \frac{1}{T^2} dT$$

$$\text{soit} \quad \log x_0 \gamma_0 = \frac{L_0}{R} \left[\frac{1}{T_0} - \frac{1}{T} \right]$$

$$\text{ou} \quad \log x_0 \gamma_0 = \frac{L_0}{R} \left[\frac{T - T_0}{T_0 T} \right]$$

En appelant Δ l'abaissement cryoscopique du solvant l'expression précédente s'écrit :

$$\log x_0 \gamma_0 = - \frac{L_0 \Delta}{R \cdot T_0 T}$$

Si γ_0 est voisin de 1, ce qui est le cas dans nos expériences où γ_0 est toujours supérieur à 0,99, on peut écrire

$$\text{Log } x_o = - \frac{L_o \Delta}{R \cdot T_o T} , \text{ ou encore}$$

$$\text{Log } x_o = - \frac{L_o \Delta}{R \cdot T_o^2} \quad \text{puisque } T \text{ est très peu diffé-}$$

rent de T_o . Si l'on exprime x_o en fonction des fractions molaires des solutés de la solution $\sum x_s$, l'expression précédente devient

$$\text{Log } (1 - \sum x_s) = - \frac{L_o \Delta}{R T_o^2}$$

Il s'ensuit, étant donné que $\sum x_s$ est négligeable et que dans ces conditions on a $\text{Log } (1 - \sum x_s) \simeq - \sum x_s$,

$$- \sum x_s = - \frac{L_o \Delta}{R \cdot T_o^2}$$

soit $\Delta = \frac{R \cdot T_o^2}{L_o} \sum x_s$

S'il n'y a qu'un soluté ou si l'on assimile la solution à une solution contenant x_s moles de soluté dans x_o moles d'eau libre

$$\Delta = \frac{R \cdot T_o^2}{L_o} x_s$$

avec $x_s = \frac{n_s}{n_s + n_o}$ et $x_o = \frac{n_o}{n_o + n_s}$ où n_s et n_o sont

les nombres de moles de soluté et de solvant. Il s'ensuit que $\frac{x_s}{x_o} = \frac{n_s}{n_o}$

et quand on passe aux molalités il vient :

$$m_s = \frac{n_s}{n_o M_o} \quad \text{ou} \quad m_s = \frac{x_s}{x_o M_o}$$

Si les solutions sont suffisamment diluées pour que x_0 soit très peu différent de 1

$$m_s = \frac{x_s}{M_0}$$

ce qui conduit à

$$\Delta = \frac{R \cdot T_0^2 M_0}{L_0} m_s, \text{ expression de VANT'HOFF dans}$$

laquelle on a l'habitude de remplacer l'expression $\frac{R \cdot T_0^2 M_0}{L_0}$, constante cryométrique, par k :

$$\Delta = k \cdot m_s$$

Dans nos expériences, nous avons mesuré l'abaissement cryoscopique du lait : Δl , l'abaissement de la solution de saccharose : Δs_u , et l'abaissement de la solution de saccharose dans le lait $\Delta s_u + 1$.

Pour chaque cas nous avons respectivement :

$$(1) \quad \text{Log } x_0 \gamma_0 = - \frac{L_0 \Delta l}{R \cdot T_0^2}$$

$$(2) \quad \text{Log } x'_0 \gamma'_0 = - \frac{L_0 \Delta s_u}{R \cdot T_0^2}$$

$$(3) \quad \text{Log } x''_0 \gamma''_0 = - \frac{L_0 \Delta s_u + 1}{R \cdot T_0^2}$$

Dans les conditions opératoires utilisées, pour lesquelles les solutions sont suffisamment diluées, on admet que le coefficient d'activité du solvant, que l'on peut calculer par (2) puisque l'on connaît x'_0 et Δs_u , reste constant : $\gamma_0 = \gamma'_0 = \gamma''_0$. On peut alors calculer l'eau liée par la formule de VAN T'HOFF. On a en effet, dans le cas de la solution contenant uniquement du saccharose :

$$\Delta_{su} = k \cdot \frac{\frac{m}{M}}{P} = K \cdot \frac{\frac{34,224}{342,24}}{89,2}$$

où m = masse de saccharose pour 100 g d'eau.

M = masse molaire du saccharose.

$P = 89,2$ = quantité de solvant libre puisque une môle de saccharose est hexa hydratée en solution aqueuse.

k = constante cryométrique de l'eau = $1,858^\circ$

Soit
$$\Delta_{su} = k \cdot \frac{0,1}{89,2}$$

Quand on dissout la même masse de sucre dans un poids de lait contenant 100 g d'eau totale, l'abaissement cryoscopique dû au saccharose seul est

égal à
$$\Delta'_{su} = k \frac{0,1}{89,2 - e}$$
 où e est la quantité correspondante

d'eau liée. Si l'on appelle Δa l'abaissement cryoscopique global de la solution de lait sucrée, l'augmentation de l'abaissement cryoscopique dû au sucre ajouté est égale à :

$$\Delta'_{su} - \Delta_{su} = \Delta a - (\Delta_{su} + \Delta l)$$

Posons $\Delta'_{su} - \Delta_{su} = \Delta x$, il vient

$$\Delta x = k \cdot 0,1 \left(\frac{1}{89,2 - e} - \frac{1}{89,2} \right),$$

divisons les deux membres de l'expression par Δ'_{su} :

$$\frac{\Delta x}{\Delta'_{su}} = \frac{\frac{e}{(89,2 - e) 89,2}}{\frac{1}{89,2 - e}} = \frac{e}{89,2}$$

d'où
$$e = \frac{\Delta x \cdot 89,2}{\Delta'_{su}}$$
, expression de Newton et Gortner (1922) qui donne la quantité d'eau

liée pour 100 g d'eau totale. Comme $\Delta'_{su} = \Delta a - \Delta l$, la détermination de l'eau liée implique la mesure de l'abaissement cryoscopique du lait seul, de

la solution aqueuse de saccharose et de la solution de saccharose dans le lait, soit trois déterminations successives.

On pourrait théoriquement déterminer uniquement Δa et Δl puisque

$$\Delta a - \Delta l = \Delta'su = k \cdot \frac{0,1}{89,2 - e}$$

d'où

$$e = 89,2 - \frac{0,1 k}{\Delta'su}$$

expression qui est équivalente à celle de Newton et Gortner. En effet, si l'on remplace dans cette dernière Δx par $\Delta'su - \Delta su$ il vient :

$$e = 89,2 - \frac{89,2 - \Delta su}{\Delta su}$$

et l'on sait que $\Delta su = k \cdot \frac{0,1}{89,2}$ soit $89,2 \Delta su = 0,1 k$. En

réalité Δsu n'est pas constant et varie légèrement d'une détermination à une autre comme l'ont signalé PYENSON et DAHLE (1938) et ALLEMANN (1940). Sa valeur est toujours supérieure à la valeur théorique de 2,0829 que l'on peut calculer. Il est donc préférable d'utiliser l'expression

$$e = 89,2 - \frac{89,2 \Delta su}{\Delta'su}$$

qui fait intervenir Δl , Δsu et Δa .

L - ELECTROPHORESE EN GEL D'AMIDON.

Nous avons utilisé la technique de WAKE et BALDWIN (1961), en milieu d'urée, avec addition de 2-mercaptoéthanol.

Le gel est préparé 16 à 20 heures avant son utilisation en mélangeant 55 g d'amidon, 246 ml d'eau distillée et 42 ml de tampon TRIS à pH 8,6. On agite doucement pour obtenir une suspension bien homogène en chauffant légèrement.

Quand le gel devient transparent on arrête le chauffage et on ajoute 176,5 g d'urée et 0,82 ml de mercaptoéthanol. Le gel est alors agité énergiquement puis dégazé et coulé dans des moules spéciaux formés de trois cadres en matière plastique superposés.

Les dépôts sont réalisés par introduction verticale dans le gel, de petits morceaux de papier d'Arches plus ou moins imprégnés de la solution de protéines à étudier. Pour une bonne migration, le gel d'amidon est relié aux électrodes par des bandes de papier d'Arches plongées dans le tampon à l'acide borique.

L'électrophorèse est poursuivie pendant 18 h environ sous une tension de 250 volts (15 volts/cm) à la température de 4°C. Quand la migration est terminée, le gel est découpé en trois plaques de gel d'épaisseur à peu près équivalentes, qui seront toutes colorées au Noir Amido. La plaque de gel intermédiaire donne en général les meilleurs résultats.

REACTIFS.

- Tampon TRIS : pH 8,6. Dissoudre 92,06 g de TRIS (hydroxyméthyl)-aminométhane dans un litre d'eau. Ajuster le pH à 8,6 avec de l'acide citrique.

- Tampon acide borique : pH 8,6 : dissoudre 18,6 g d'acide borique dans 100 ml d'eau distillée. Ajuster à 8,6 avec de la soude concentrée.

- Solution colorante

Noir amido 10 B	6 g
Méthanol	500 ml
Acide Acétique	100 ml
H ₂ O	500 ml

- Solution décolorante

Méthanol	500 ml
Acide acétique	100 ml
H ₂ O	500 ml
Glycérol	100 ml.

III - R E S U L T A T S

A - COMPOSITION ET COAGULABILITE DU LAIT RECONSTITUE.

La composition du lait reconstitué à partir de poudre Spray, que nous avons utilisé, est donnée dans le tableau 2

TABLEAU 2 - COMPOSITION DU LAIT RECONSTITUE A 10 %

pH =	6,6
Matière sèche	91,50 g/kg
Azote total	5,16 g/kg
Matières azotées	32,92 g/kg
Caséine	25,8 g/kg
Calcium total	1,21 g/kg
Phosphore total	0,87 g/kg
Lactose hydraté	48,1 g/kg
Abaissement cryoscopique	- 0,498°

Ce lait n'a subi qu'un traitement thermique limité et il possède une aptitude à la coagulation par la présure très supérieure à celle des laits en poudre ordinaires. La figure 8 montre les thrombélastogrammes obtenus avec un lait en poudre Spray ordinaire et le lait normalement utilisé dans les mêmes conditions de reconstitution et d'emprésurage (12 %, pH 6,6 , 35°). On peut voir que le lait n°2 flocule beaucoup plus vite et que le coagulum qu'il permet d'obtenir acquiert très rapidement des propriétés mécaniques importantes.

Le tableau 3 montre en outre que sa coagulabilité par la présure est beaucoup moins modifiée par l'addition de calcium que le lait n°1. L'addition de 0,2 ml de solution de Ca Cl_2 à 10 % pour 100 ml de lait n'entraîne en effet qu'une réduction de 27,6 % du temps de floculation dans le cas du lait utilisé dans nos essais contre une réduction de plus de 49 % pour le lait ordinaire.

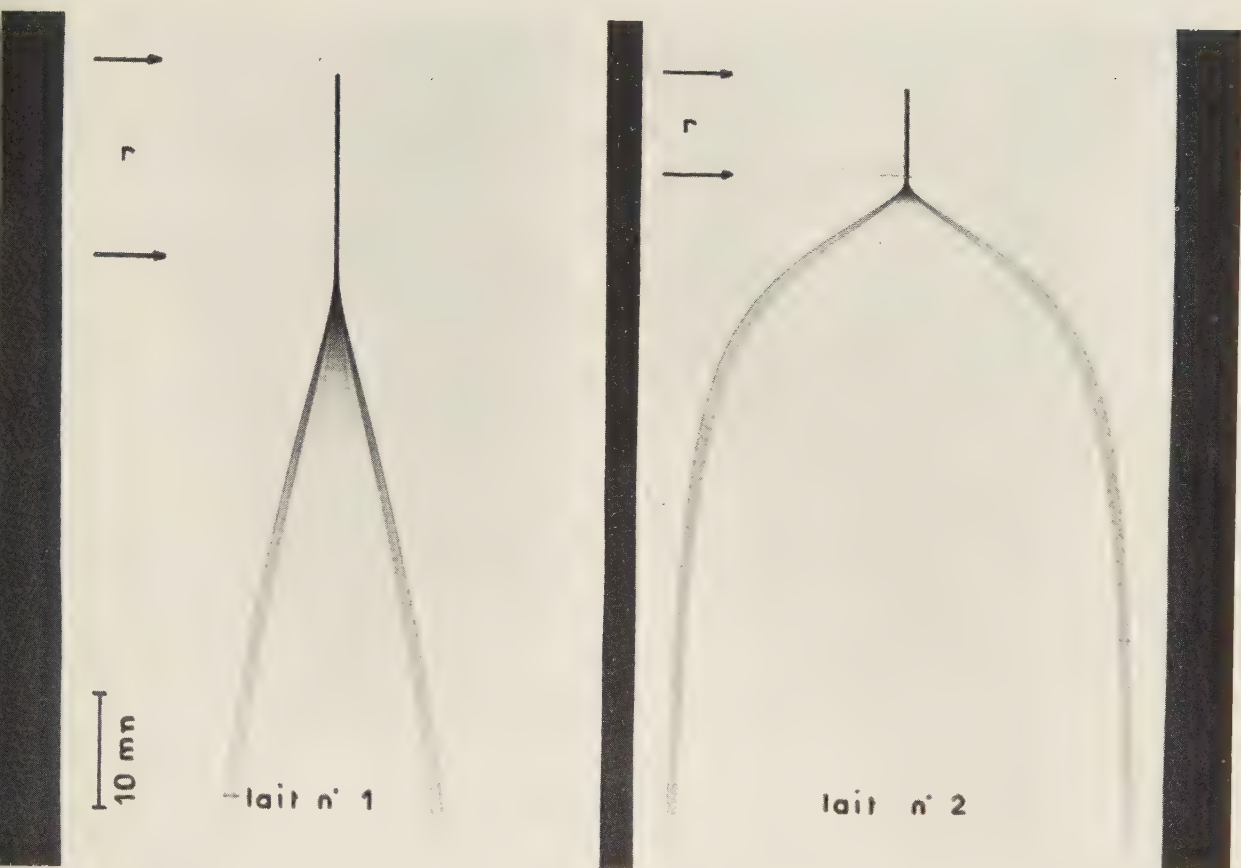


FIG.8 : Diagrammes thrombélastographiques obtenus avec les laits en poudre n°1 (lait ordinaire) et n°2 (lait des expériences).

TABLEAU 3 - COAGULABILITE DES LAITS EN POUDRE.

Calcium ajouté (CaCl ₂ 10 %)	temps de floculation en mn et fractions centésimales	
	Lait Spray Ordinaire	Lait Spray des Expériences
0	32,5	11,75
0,2 ml p.100 ml	16,5	8,5

B - VALIDITE DES METHODES UTILISEES.

Nous avons insisté sur les protocoles expérimentaux des méthodes analytiques utilisées car ce sont toutes des méthodes délicates et susceptibles d'être utilisées avec profit dans les laboratoires industriels.

1 - TECHNIQUE THROMBELASTOGRAPHIQUE.

La technique thrombélastographique convient parfaitement pour étudier la formation et la rétraction d'un gel de caséinate à condition de tenir compte d'un certain nombre d'impératifs imposés par la réalisation technique de l'appareil ou par la nature biochimique du phénomène étudié.

Ainsi nous avons vu que la température de la cuve de mesure est assurée par la platine métallique qui l'entoure et dans laquelle est maintenue une circulation d'eau à la température désirée. Cependant, le mouvement alternatif imposé à la cuve interdit tout contact direct entre ses parois et la platine thermostatée. La mince couche d'air qui sépare de ce fait la cuve de la platine a les désavantages de ralentir les échanges thermiques entre ces deux éléments et d'entraîner des variations de température dans la cuve si des turbulences se produisent dans l'air ambiant. Cette imperfection technique peut être facilement corrigée en plaçant l'appareil dans une enceinte fermée et thermostatée.

Nous verrons que la température a également une importance très grande sur le phénomène enzymatique qui constitue la première phase de la

coagulation du lait par la présure. En particulier, les variations de température subies par le lait au moment de l'emprésurage ou immédiatement après peuvent être la cause principale de la mauvaise reproductibilité du phénomène. Or, pour effectuer une mesure thrombélastographique sur un lait donné, on ne peut opérer que suivant deux modes d'emprésurage : ou bien emprésurer une quantité de lait suffisamment importante pour pouvoir utiliser une quantité de présure elle-même assez forte, ou bien emprésurer directement dans la cuve du thrombélastographe en utilisant des quantités d'enzyme très faibles, de l'ordre de quelques micro litres. Dans ce dernier cas il faut utiliser des micropipettes et prendre soin d'homogénéiser correctement la solution lait + présure par plusieurs enfoncements et relèvements du cylindre plongeur. Le moment de l'emprésurage est connu avec une imprécision de 3 à 5 sec. mais par contre, la cuve, le lait et le cylindre plongeur sont rigoureusement à la bonne température. Quand on emprésure au contraire dans un récipient annexe de forte capacité qui est agité convenablement, l'homogénéisation de la solution de présure dans le lait est pratiquement immédiate et l'imprécision sur le début du phénomène réduite à 1 ou 2 sec. Les difficultés résident dans ce cas dans le préchauffage du cylindre plongeur qui ne peut être porté à la température de l'expérience que par un séjour à l'étuve ou dans la cuve elle-même, et dans le prélèvement des 0,35 ml de lait emprésuré. En effet, si le lait est prélevé avec une pipette plus froide de quelques degrés il est immédiatement refroidi de manière suffisamment importante pour modifier fortement l'analyse thrombélastographique.

Une autre imperfection de la technique réside dans le principe même de la méthode quand il s'agit de mesurer le temps de floculation d'un lait emprésuré. En effet, pour que le tracé thrombélastographique se déroule et que l'on puisse mesurer le temps de floculation, il faut que le coagulum soit suffisamment formé pour faire suivre au cylindre les mouvements de la cuve : à ce moment là le point de floculation est dépassé. On pourrait s'en rapprocher en utilisant des fils de torsion encore plus sensibles mais on est limité par leur résistance mécanique qui doit être suffisante pour permettre les manipulations. Il y aura donc toujours un décalage entre le temps de floculation thrombélastographique et le temps de floculation que l'on peut observer par la méthode directe de SOMMER et MATSEN (1935). Pour pouvoir apprécier ce décalage nous avons effectué cinq séries d'essais portant sur des laits de mélange crus et écrémés, en comparant chaque fois le

temps de floculation observé par la méthode directe au temps de floculation thrombélastographique. Le tableau n°4 montre les temps obtenus pour l'une des séries qui ont toutes donné des résultats concordants.

TABLEAU 4 - COMPARAISON DES TEMPS DE FLOCULATION OBTENUS PAR LES METHODES DIRECTE ET THROMBELASTOGRAPHIQUE.

N°	Temps de floculation en secondes	
	méthode directe	méthode thrombélastographique
1	267	270
2	257	285
3	262	270
4	264	276
5	264	279
6	265	273
7	264	270
8	266	285
9	264	279
10	271	288
Moyenne	264,4	277,5
Ecart type	3,6	6,8

On constate que la technique thrombélastographique donne des résultats plus variables que la méthode directe conventionnelle et que les temps de floculation sont également sensiblement plus longs.

Il faut noter à ce propos que l'écart observé entre les deux temps de floculation dépend des caractéristiques physiques du coagulum en formation. Un lait d'acidité peu élevée, riche en extrait sec dégraissé, équilibré en matières minérales et emprésuré avec une quantité élevée de présure donnera un coagulum dont la fermeté augmentera rapidement, et pour lequel l'écart observé entre les deux méthodes sera faible. Au contraire un lait dont l'équilibre salin est détruit, pauvre en protéines, donnera un gel mou à évolution lente pour lequel l'écart sera important. On mesure en effet dans la méthode directe la rupture de la suspension micellaire des caséines, phénomène bien apparent dans les conditions utilisées, et dans la méthode thrombélastographique l'augmentation des propriétés mécaniques du coagulum consécutive à la rupture de la suspension et à la soudure des micelles et agglomérats de micelles entre eux.

Enfin on doit remarquer que la thrombélastographie permet de suivre l'évolution du coagulum pendant sa formation et une partie seulement de sa rétraction. En effet, dès que le gel aura exsudé suffisamment de sérum pour annuler la liaison cuve-cylindre plongeur, le tracé photographique redeviendra unique sans que pour cela la synérèse soit terminée. La figure 5a est une représentation de ce phénomène. On voit clairement qu'après coagulation se produit une phase de rétraction se traduisant par le rétrécissement du tracé à mesure que le cylindre plongeur se désolidarise de la cuve de mesure. Finalement le tracé redevient unique et linéaire comme il l'était avant la floculation. La figure 5b donne les courbes de contraction du coagulum et de séparation du sérum obtenues par la méthode thrombélastographique et la méthode volumétrique décrite au paragraphe II.D. La courbe représentant la rétraction du tracé thrombélastographique a été obtenue en portant en ordonnée la différence entre l'amplitude maximale A_m et l'amplitude à l'instant considéré et en abscisse le temps écoulé depuis le début de la rétraction. Pour la courbe correspondant à la méthode volumétrique on a simplement porté en ordonnée le volume de sérum séparé et le temps en abscisse. On observe une évolution semblable de la rétraction du tracé et du volume de sérum recueilli. Cependant les courbes ne sont pas superposables : dans les deux cas, elles changent nettement de pente mais après des temps différents ; celle du sérum recueilli vers 8-10 mn, celle du tracé vers 25 mn.

Les différences proviennent de ce que la séparation du sérum est fortement influencée par les actions mécaniques qui s'exercent sur le coagulum ; le simple soulèvement du gel constitue une action mécanique à

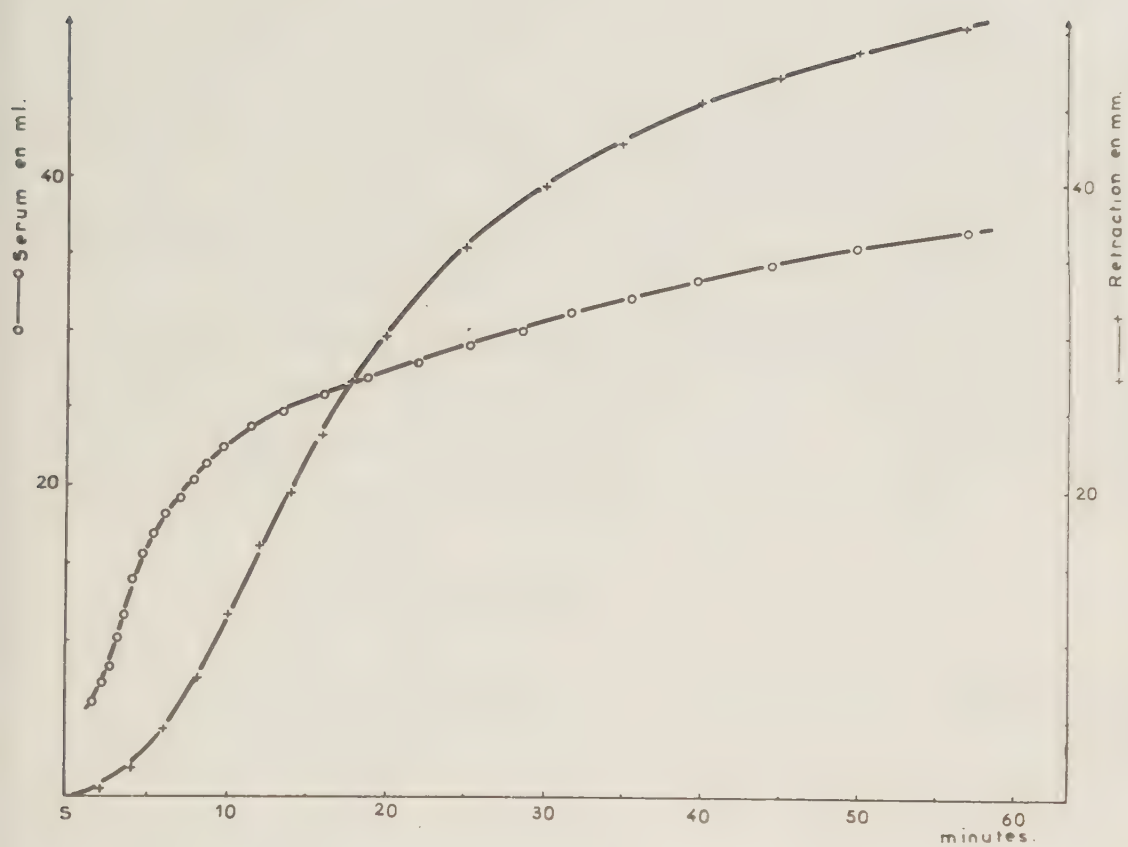


FIG. 5 b : Courbes représentant la synérèse du coagulum
 o méthode volumétrique
 x rétraction du tracé thrombélástico.

laquelle s'ajoute le fait que le gel ne baigne plus dans son sérum, ce qui favorise la synérèse et l'égouttage (LAWRENCE 1959). Au contraire dans le cas du thrombélastographe, le caillé subit seulement une torsion assez faible puisque l'amplitude des oscillations de la cuve de mesure n'est que de 4 degré 45 mn. D'autre part ces deux courbes tendent vers un palier, celle du sérum un peu plus rapidement que celle du tracé ; dans le premier cas le palier correspond au volume maximal de sérum égoutté, dans le deuxième cas il correspond simplement à une quantité de sérum telle que la liaison entre la cuve de mesure et le cylindre plongeur est supprimée. On peut donc utiliser la thrombélastographie dans l'étude de la synérèse à condition d'avoir présent à l'esprit le fait qu'il n'est pas possible de contrôler le phénomène dans sa totalité par cette méthode.

2 - ULTRACENTRIFUGATION.

Nous avons utilisé l'ultracentrifugation pour mesurer l'eau d'hydratation de laits normaux et aussi celle de laits concentrés d'extrait sec élevé. Il était donc nécessaire d'étudier l'effet de l'augmentation du taux de matière sèche et de la variation de viscosité qui en résulte sur la sédimentation du phosphocaseinate.

Dans une première série d'essais nous avons centrifugé un lait reconstitué d'extrait sec dégraissé normal égal à 9,1 % aux vitesses de 10 000, 15 000, 29 000, 40 000 et 50 000 tours/minute correspondant à des champs centrifuges maxima de 8 000, 17800, 68 000, 126 000 et 198 000 x g. pour la centrifugeuse et le rotor utilisés.

Les résultats du tableau 5 montrent que la vitesse de 29 000 t/mn (champ de 68 000 x g) suffit pour obtenir le maximum de substances sèches sédimentées. Il n'est donc pas nécessaire dans ce cas de centrifuger au dessus de 100 000 x g contrairement à ce qu'indiquent SABARWAL et GANGULI (1971).

TABEAU 5 - INFLUENCE DE LA VITESSE DE CENTRIFUGATION SUR LA COMPOSITION ET L'HYDRATATION DU SEDIMENT D'UN LAIT NORMAL ECREME.

Résultats en g/kg de lait	Champ centrifuge maximal (35 mm 37°C)				
	8000xg	17800xg	68000xg	126000xg	198000xg
Eau d'hydratation	44,1	66,75	67,10	65,9	62
Sédiment sec	15,6	27,6	33,9	33,4	33,4
Azote du sédiment	1,89	3,37	4,17	4,24	4,17
Calcium du sédiment	0,42	0,68	0,90	0,87	0,88
Phosphore du sédiment	0,15	0,36	0,40	0,42	0,42

Dans une deuxième série d'expériences nous avons centrifugé à 68000, 126000 et 198000 x g cinq laits dont la teneur en matière sèche était comprise entre 9,1 et 25,6 %. La figure 9 montre que le poids de sédiment recueilli après centrifugation augmente linéairement avec l'extrait sec ; cependant l'allure de la courbe obtenue à 68000 x g indique que le champ est insuffisant quand la teneur en matière sèche du lait dépasse 22 %.

3 - CRYOSCOPIE.

a) Correction de concentration.

Dans la technique de l' "A.O.A.C." que nous avons utilisée il est impossible d'obtenir dans chaque cas une surfusion constante ; en pratique on constate des surfusions variant de 0,8 à 1,2 degrés. Ces différences entraînent la congélation d'une quantité variable de solvant au moment de la cessation de la surfusion. Il s'ensuit que la solution restante dont la température est mesurée par le thermomètre, est concentrée différemment et conduit donc à des abaissements cryoscopiques différents et trop élevés par rapport aux abaissements réels de la solution initiale. Il est donc nécessaire d'opérer une correction pour tenir compte de ce phénomène de concentration dont l'importance varie avec celle de la surfusion. Cette correction est facile à déterminer.



FIG.9 : Variation du poids de sédiment en fonction de la concentration du lait.

Si P est la masse initiale du solvant pur de la solution avant le début de la congélation, S la chaleur spécifique du solvant, U les degrés de surfusion et l la chaleur latente de congélation du solvant, la quantité de solvant congelée est égale à

$$\frac{P \cdot S \cdot u}{l}.$$

La quantité de solvant restant liquide à ce moment là est

$$P \left(1 - \frac{SU}{l} \right).$$

La concentration de la solution, qui était initialement C devient C'

$$C' = C \times \frac{1}{1 - \frac{SU}{l}},$$

et le nouvel abaissement cryoscopique est donc :

$$\Delta' = \Delta \cdot \frac{1}{1 - \frac{SU}{l}}$$

L'abaissement cryoscopique initial de la solution peut donc être calculé en fonction de l'abaissement mesuré :

$$\Delta = \Delta' \left(1 - \frac{SU}{l} \right)$$

Dans le cas où le solvant est l'eau, seul cas qui nous intéresse, on peut prendre 1 et 80 respectivement comme valeurs pour S et l . La formule précédente devient

$$\Delta = \Delta' (1 - 0,0125 U).$$

A partir de cette formule HARRIS (1925) a calculé le facteur de correction $(1 - 0,0125 U)$ à appliquer à chaque abaissement cryoscopique en fonction des surfusions utilisées. Les tables qu'il a ainsi réalisées (tableau 6)

et que nous reproduisons en raison de leur utilité, permettent rapidement de corriger l'influence de la concentration de la solution au moment de la cristallisation. Pour une surfusion de 1,42 degré par exemple, la table indique que le facteur de correction à appliquer à l'abaissement cryoscopique mesuré est égal à 0,982 250). Cette correction ne supprime pas les autres imperfections de la technique.

En particulier, l'inertie thermique du thermomètre à mercure étant importante, il peut s'écouler un temps appréciable entre la fin de la surfusion et la stabilisation du mercure au point le plus haut de sa remontée. Pendant ce temps, une partie de la chaleur dégagée dans la solution par la cessation de la surfusion peut être absorbée par le bain extérieur, ce qu'il faut éviter.

TABLEAU 6 - TABLE DE CORRECTION DE CONCENTRATION SELON HARRIS.

Degrés de Surfusion				Trois derniers chiffres du facteur de correction							
6	4	2	0	875	750	625	500	375	250	125	000
Trois premiers chiffres du facteur de Correction				Centièmes de degrés de surfusion							
0,925	0,950	0,975	1,000	-	-	-	-	-	-	-	0,00
0,924	0,949	0,974	0,999	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
0,923	0,948	0,973	0,998	0,09	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16
0,922	0,947	0,972	0,997	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,22	0,23	0,24
0,921	0,946	0,971	0,996	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32
0,920	0,945	0,970	0,995	0,33	0,34	0,35	0,36	0,37	0,38	0,39	0,40
0,919	0,944	0,969	0,994	0,41	0,42	0,43	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48
0,918	0,943	0,968	0,993	0,49	0,50	0,51	0,52	0,53	0,54	0,55	0,56
0,917	0,942	0,967	0,992	0,57	0,58	0,59	0,60	0,61	0,62	0,63	0,64
0,916	0,941	0,966	0,991	0,65	0,66	0,67	0,68	0,69	0,70	0,71	0,72
0,915	0,940	0,965	0,990	0,73	0,74	0,75	0,76	0,77	0,78	0,79	0,80
0,914	0,939	0,964	0,989	0,81	0,82	0,83	0,84	0,85	0,86	0,87	0,88
0,913	0,938	0,963	0,988	0,89	0,90	0,91	0,92	0,93	0,94	0,95	0,96
0,912	0,937	0,962	0,987	0,97	0,98	0,99	-	-	-	-	-
Degrés de Surfusion				Trois derniers chiffres du facteur de correction							
7	5	3	1	875	750	625	500	375	250	125	000
Trois premiers chiffres du facteur de Correction				Centièmes de degré de surfusion							
0,912	0,937	0,962	0,987	-	-	-	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04
0,911	0,936	0,961	0,986	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12
0,910	0,935	0,960	0,985	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20
0,909	0,934	0,959	0,984	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28
0,908	0,933	0,958	0,983	0,29	0,30	0,31	0,32	0,33	0,34	0,35	0,36
0,907	0,932	0,957	0,982	0,37	0,38	0,39	0,40	0,41	0,42	0,43	0,44
0,906	0,931	0,956	0,981	0,45	0,46	0,47	0,48	0,49	0,50	0,51	0,52
0,905	0,930	0,955	0,980	0,53	0,54	0,55	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60
0,904	0,929	0,954	0,979	0,61	0,62	0,63	0,64	0,65	0,66	0,67	0,68
0,903	0,928	0,953	0,978	0,69	0,70	0,71	0,72	0,73	0,74	0,75	0,76
0,902	0,927	0,952	0,977	0,77	0,78	0,79	0,80	0,81	0,82	0,83	0,84
0,901	0,926	0,951	0,976	0,85	0,86	0,87	0,88	0,89	0,90	0,91	0,92
0,900	0,925	0,950	0,975	0,93	0,94	0,95	0,96	0,97	0,98	0,99	-

En pratique, on opère dans des conditions telles que les pertes de chaleur soient les plus faibles possibles pendant un temps le plus court possible, la solution idéale étant l'utilisation de thermistances ou de résistances de platine dont l'inertie est très inférieure à celle du thermomètre classique.

b) Répercussions de la surfusion sur les lectures effectuées.

Théoriquement, plus la surfusion est importante et plus la solution est concentrée, plus l'erreur observée sur l'abaissement cryoscopique doit être importante. Pratiquement, cela devrait se traduire par une augmentation de l'abaissement cryoscopique ; en réalité, dans les conditions opératoires utilisées, quelle que soit l'agitation utilisée et quel que soit le fluide de contact employé entre le bain et le tube renfermant la solution, le point le plus haut atteint par le mercure du thermomètre est d'autant plus élevé que la surfusion est forte. Autrement dit, à une plus forte surfusion correspond un abaissement cryoscopique plus faible, ce qui est contraire à la théorie.

En effet, lors de la cessation de la surfusion, la quantité de chaleur dégagée devrait faire remonter le mercure au point correspondant à l'abaissement cryoscopique de la solution finale, en admettant que le système soit adiabatique. On devrait avoir une lecture d'autant plus haute que la surfusion serait faible. Les résultats contraires observés peuvent s'expliquer comme suit :

S'il n'y a ni surfusion, ni échanges thermiques entre la solution et le milieu extérieur, la température indiquée par le thermomètre est t . S'il se produit une surfusion faible sans échanges thermiques, la température indiquée est t' inférieure à t du fait seul de la concentration par **congélation** d'une partie du solvant. S'il se produit à la fois une surfusion faible et des échanges thermiques dans le sens solution milieu extérieur, la température finalement observée est $t'' < t'$.

La figure 10 indique ces différentes possibilités.

Si la surfusion est forte sans échanges thermiques, la température indiquée est t_1 inférieure à t' du fait de la plus forte concentration de la solution finale. Si la surfusion forte est suivie par des échanges thermiques on doit normalement observer une température t_2 inférieure à t'' .

En réalité la température indiquée est supérieure à t'' car la formation d'un étui important de glace à la périphérie de la solution, gêne les

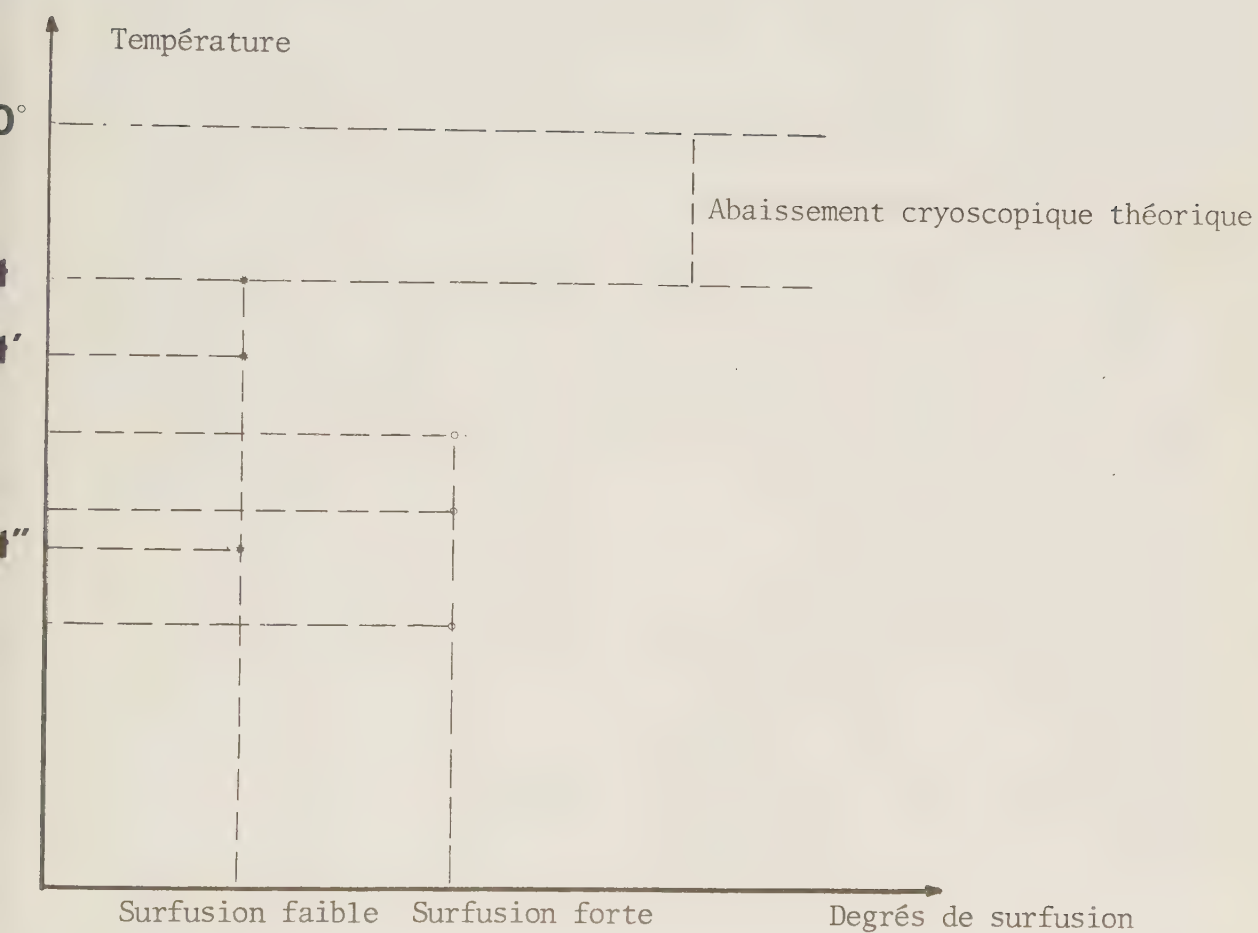


FIG.10 : Evolution de la température de la solution en fonction de l'importance de la surfusion.

échanges thermiques et tend à transformer le milieu en système adiabatique : la température mesurée t_3 est supérieure à t' (fig.10). Le tableau 7 donne des exemples de ce phénomène.

c) Influence de l'agitation.

Il est très important que la température de la solution soit homogène au moment où l'on effectue les mesures, ce qui rend nécessaire l'agitation. Elle a en outre l'avantage d'accélérer les échanges pendant la phase de refroidissement et donc d'accélérer la mesure. Elle doit être interrompue pendant la remontée du mercure pour minimiser les échanges entre la solution et le milieu extérieur. Le tableau 7 montre que le maintien de l'agitation peut fausser considérablement les mesures.

Cependant, la lecture doit être faite dans une solution parfaitement homogène et, si l'on n'agite pas du tout la solution après la cessation de la surfusion, il se crée dans le liquide un gradient de concentration et par conséquent de température. Le résultat en est une détermination inexacte de l'abaissement cryoscopique de la solution. Il faut donc un minimum d'agitation au moment de la lecture.

TABEAU 7 - INFLUENCE DE LA SURFUSION, DE L'AGITATION ET DU FLUIDE DE CONTACT.

	<i>Sans Alcool</i>		<i>Avec Alcool</i>	
	Surfusion °C	Abaissement cryoscopique	Surfusion °C	Abaissement cryoscopique
Avec agitation pendant	0,07	0,558	0,25	0,571
le dégagement de	0,66	0,543	0,75	0,559
chaleur	1,24	0,546	1,21	0,556
Sans agitation pendant	0,11	0,551	0,30	0,552
le dégagement de	0,65	0,537	0,64	0,546
chaleur	1,25	0,535	1,13	0,541

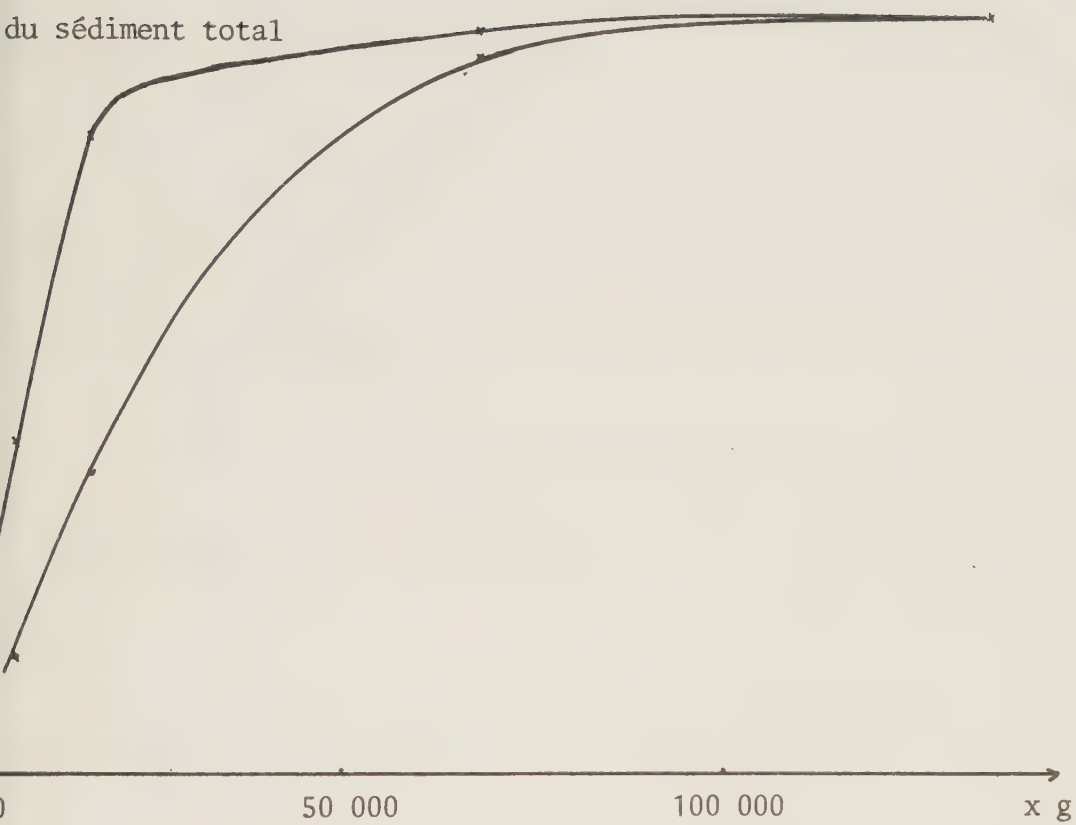


FIG.11 : Sédimentation du lait normal et du lait concentré en fonction du champ utilisé.

d) Influence du fluide de contact.

La solution idéale pour mesurer la température de congélation d'un milieu est que les échanges thermiques avec l'extérieur soient nuls, autrement dit que le milieu constitue un système adiabatique. On peut tendre vers cet état en isolant le tube échantillon du bain réfrigérant par de l'air à la place du mélange alcoool + eau que l'on utilise habituellement. Cela se traduit par un refroidissement très lent de la solution (le temps est pratiquement doublé) et par une remontée légèrement plus forte du mercure, comprise entre 5 et 10 millièmes de °C, donc plus proche de la réalité (tableau 7). Cependant, étant donné que cette erreur entache tous les résultats, qu'elle est relativement faible ou nulle, en définitive puisque on mesure des différences d'abaissements cryoscopiques, et qu'elle nécessite une perte de temps très importante pour être éliminée, il semble préférable d'utiliser un liquide de contact du genre alcoool + eau.

e) Autres causes possibles d'erreurs.

Pour toutes les mesures il faut se placer dans des conditions identiques. En particulier :

- le volume de solution placé dans le tube doit être constant

- l'agitation doit se faire de manière identique pour des solutions de même concentration. Si la concentration varie l'agitation doit varier pour que la vitesse de refroidissement reste du même ordre.

- l'écart entre la température du bain et le point de congélation des solutions doit rester à peu près constant.

- le thermomètre (ou la sonde) doit rester au centre du tube, plonger également dans chaque solution et sa position par rapport au fond doit être constante à cause du gradient de température qui se crée dès la cessation de la surfusion. Il faut en effet mesurer la température au centre de la solution qui correspond à la zone "adiabatique".

- enfin, dans le cas de l'emploi d'un thermomètre à mercure, il faut tenir compte de l'influence de la température ambiante sur la dilatation de la colonne de mercure située hors de la solution et opérer une correction dite de "colonne émergente".

4 - ABSORPTION ATOMIQUE.

Les dosages de calcium et de magnésium par spectrophotométrie d'absorption atomique se font généralement dans les produits alimentaires après destruction de la matière organique par voie sèche ou humide (MURTHY et RHEA 1967, FRAZEUR 1967, LINDEN 1971).

Etant donnée la durée de préparation de l'échantillon qu'elle nécessite, nous avons utilisé couramment une méthode faisant intervenir la simple dilution de l'échantillon, en gardant la technique de destruction par voie sèche comme technique de référence.

Dans ce cas les incinérations sont effectuées dans des creusets en platine à une température comprise entre 500 et 550°C (PIEN 1968), après évaporation complète de l'eau dans le cas d'échantillons liquides. Pour contrôler cette technique nous avons incinéré des fractions de 1g de poudre de lait additionnées d'un nombre connu de mg de calcium ou de Magnésium. Dans tous les cas les cendres ont été reprises par un minimum d'acide chlorhydrique et la solution amenée à 100 ml. Pour l'analyse photométrique (Spectrophotomètre Jobin Yvon, modèle Delta) on reprend 10 ml de cette solution, on ajoute 20 ml de chlorure de Lanthane à 5 % comme tampon spectral et on complète à 200 ml. Le tableau 8 montre que la concordance des résultats obtenus est excellente.

Dans la méthode par simple dilution on dilue 1g de lait frais ou reconstitué à 200 ml en présence de 20 ml de chlorure de Lanthane à 5 %. Pour éviter toute précipitation des matières protéiques on dilue le lait à l'aide de 100 ml d'eau distillée environ avant d'ajouter le lanthane et de compléter à 200 ml. Le tableau 8 montre que les résultats trouvés par les deux méthodes sont concordants. Il est donc justifié de remplacer la méthode par incinération par la méthode par simple dilution dans les conditions utilisées.

TABLEAU 8 - a) CONTROLE DE L'INCINERATION PAR VOIE SECHE ET

b) COMPARAISON AVEC LA SIMPLE DILUTION.

a	Calcium	Magnésium
Témoin	1,3 g	0,086 g
+ 1g de Calcium ou 0,1g de Magnésium	2,295 g	0,186 g
+ 2g de Calcium ou 0,2g de Magnésium	3,305 g	0,287 g
b	Calcium	Magnésium
Cendres 1	1,13	0,096
Cendres 2	1,13	0,096
simple dilution 1	1,12	0,094
simple dilution 2	1,13	0,097

C - HYDRATATION DES CASEINES.

1 - COMPOSITION ET HYDRATATION DES MICELLES DE PHOSPHOCASEINATE DANS LES LAITS NORMAL ET CONCENTRE.

a) Composition du phosphocaséinate.

Les quatre fractions de phosphocaséinate de calcium obtenues par centrifugations successives dans des champs croissants sont inégales en poids et les variations ne sont pas les mêmes dans le lait normal et le lait concentré comme le montre le tableau 9. La sédimentation est plus rapide dans le lait normal que dans le lait concentré ; avec $17800 \times g$ on a déjà obtenue 85 % du sédiment total dans le premier cas et seulement 42,0 % dans le second (fig.11). Cette différence est liée à la variation de la viscosité du lait consécutive à une insolubilisation de la caséine non micellaire (ou soluble) et une agrégation des micelles.

Les sédiments de lait concentré sont plus pauvres en azote que ceux qui proviennent du lait normal ; ils sont donc plus riches en substances non azotées (sels, lactose), ce qui implique que l'eau d'hydratation ait, pour une partie au moins, une composition semblable à celle du surnageant de centrifugation. L'analyse confirme cette hypothèse en montrant que le sédiment contient du lactose qui, d'après MOCQUOT (1947) , ne peut être fixé et entraîné directement par les matières azotées au cours de leur sédimentation. En moyenne, le phosphocaséinate sédimenté à partir d'un kg de lait à 9,1 % de matière sèche contient 3 à 4 g de lactose, celui d'un lait concentré à 22 % d'extrait sec en contient 20 à 26 g.

Dans le tableau 9 les quantités de calcium et de phosphore par g de matières azotées sédimentées ont été exprimées sans déduction de la part apportée par l'eau d'hydratation. En effet, la quantité de sels et de matières azotées apportées par l'eau et retrouvées dans le sédiment est faible par rapport au phosphocaséinate.

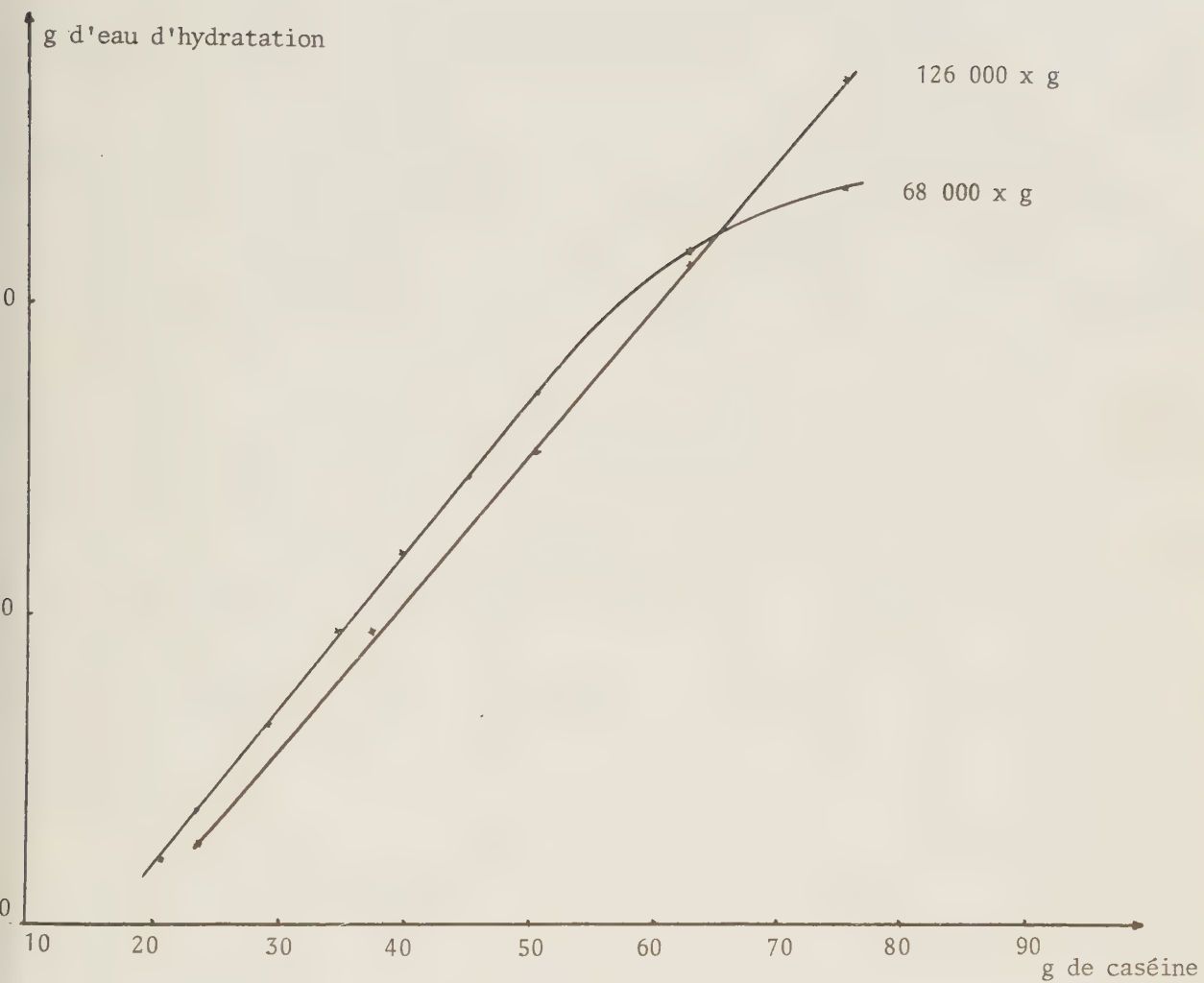


FIG.12 : Variation de l'hydratation en fonction de la teneur en caséine du lait.

TABLEAU 9 - COMPOSITION DU PHOSPHOCASEINATE DE CALCIUM SEDIMENTE DANS DIFFERENTS CHAMPS CENTRIFUGES A PARTIR DE LAIT NORMAL ET DE LAIT CONCENTRE.

	LN*	LC*	LN	LC	LN	LC	LN	LC
Champ centrifuge x g	8 000		17 800		68 000		126 000	
*** Poids de sédimentation sec en g par kg de lait	16,6 (47,1)	18,85 (17,5)	13,2 (37,5)	26,5 (24,6)	4,76 (13,5)	57,0 (58,9)	0,67 (1,9)	5,46 (5,0)
Matières azotées % du sédiment	73,5	59,2	79,5	62,7	77	63,2	84,8	60,4
Eau d'hydratation en g par g de sédiment sec	2	1,55	2,24	1,66	2,05	1,55	3	2,12
Eau d'hydratation en g par g de matières azo- tées sédimentées	2,72	2,63	2,81	2,66	2,69	2,50	3,55	3,51
Calcium en mg par g de sédiment sec	25,4	24,3	22	21,8	14,1	21,2	9,5	17
Calcium en mg par g de matières azotées sédimentées	34,6	41,1	27,7	34,8	18,3	34,2	11,3	28,1
phosphore en mg par g de sédiment sec	12,5	11,3	13,4	11,8	12,5	11,5	2,96	8,5
phosphore en mg par g de matières azotées sédimentées	17	19,1	16,8	18,8	16,2	18,5	3,51	14

* : LN : lait à 9,15 % de matières sèches ; LC : lait à 22,07 % de matières sèches.

*** : Entre parenthèses : p.100 du sédiment total

En calcium par exemple, l'eau d'hydratation, en admettant qu'elle soit en totalité identique au surnageant de centrifugation, apporte de 20 à 30 mg de métal pour une quantité totale de 800 à 900 mg contenue dans le sédiment. Cette addition au phosphocaséinate, ne modifie pas les sens de variation observés et elle est, de plus, impossible à chiffrer exactement.

La quantité de calcium ou de phosphore du phosphocaséinate diminue des premières aux dernières fractions recueillies ; cette diminution est plus importante avec le calcium qu'avec le phosphore. Les protéines sont davantage minéralisées dans le cas du lait concentré et l'écart observé entre les deux laits augmente de la première à la dernière fraction recueillie. La concentration semble entraîner une aggrégation des micelles de caséine accompagnée d'une diminution de la sédimentation des particules malgré une augmentation de la minéralisation du phosphocaséinate.

b) Hydratation du phosphocaséinate.

Les différentes fractions obtenues sont plus fortement hydratées que le sédiment que l'on obtient en centrifugeant le lait normal ou concentré directement à 68000 ou 126000 x g. Cependant la différence observée est plus importante dans le cas du lait normal que dans le cas du lait concentré. Il est probable que la sédimentation fractionnée conduise à des sédiments humides moins denses.

Les teneurs en calcium et en phosphore des différents sédiments ont peu d'influence sur l'hydratation des matières azotées correspondantes. Le passage de la 1^e à la 3^e fraction par exemple correspond à une perte de 45 à 17 % du calcium des laits normal et concentré respectivement, qui ne peut être exclusivement responsable de la variation concomitante de l'eau d'hydratation. Seules les fractions obtenues à 126000 x g montrent une hydratation élevée qui peut être en relation avec une minéralisation plus faible.

2 - COMPOSITION DU SEDIMENT ET HYDRATATION DU PHOSPHOCASEINATE EN FONCTION DE LA TENEUR DU LAIT EN MATIERE SECHE.

a) Composition du sédiment.

Nous avons déjà signalé au paragraphe B-2 que tout le phosphocaséinate peut être sédiementé à condition de centrifuger à une vitesse suffisante pour l'extrait sec du lait utilisé. Dans ces conditions le tableau 10 montre que la totalité de l'azote caséinique insoluble passe dans le sédiment qui s'enrichit en substances non protéiques à mesure que la concentration du lait en matière sèche augmente. A partir de 22 % d'extrait

sec le champ centrifuge de 68000 x g devient insuffisant et une partie de l'azote caséinique reste dans le surnageant.

TABLEAU 10 - VARIATIONS DE LA COMPOSITION DU SEDIMENT EN AZOTE EN FONCTION DE LA TENEUR DU LAIT EN MATIERE SECHE.

ES % du lait \ champ x g	Azote du sédiment % de l'azote total du lait			Matières azotées du sédiment % du poids de sédiment sec		
	68 000	126 000	198 000	68 000	126 000	198 000
9,18	78,6	76,8	81,6	79	77,2	82
13,29	80	76,4	81,5	73,6	70,4	75
17,75	77,5	76,5	80,8	68	67,1	70,9
22,15	76,2	79,1	81	63,5	66	72,4
15,6	69,5	77	79,6	61,5	68	70,4

Le tableau 11 indique l'hydratation du phosphocaséinate de calcium et la répartition du calcium en fonction de la concentration du lait et de la valeur du champ centrifuge utilisé. On peut constater que la quantité de calcium exprimée par g de protéines sédimentées augmente légèrement avec la teneur en matière sèche du lait. La diminution avec la vitesse de centrifugation pour un même lait est normale puisqu'une partie de ce calcium est apporté par l'eau d'hydratation qui diminue elle-même avec l'augmentation du champ centrifuge.

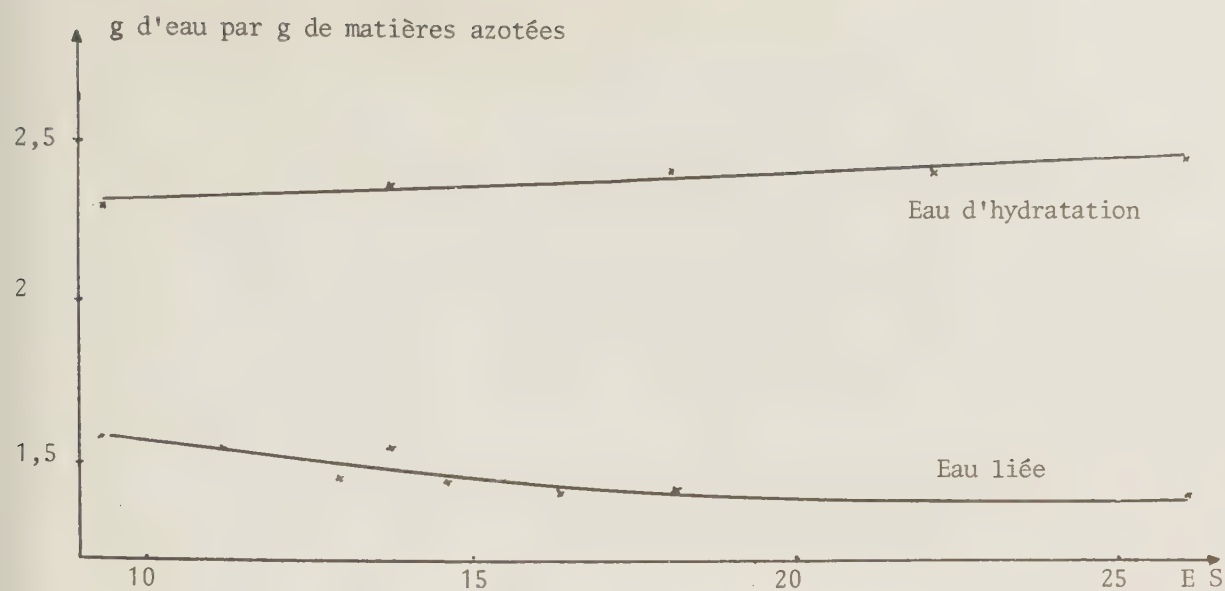


FIG. 13 : Hydratation des matières azotées en fonction de 1'E S.

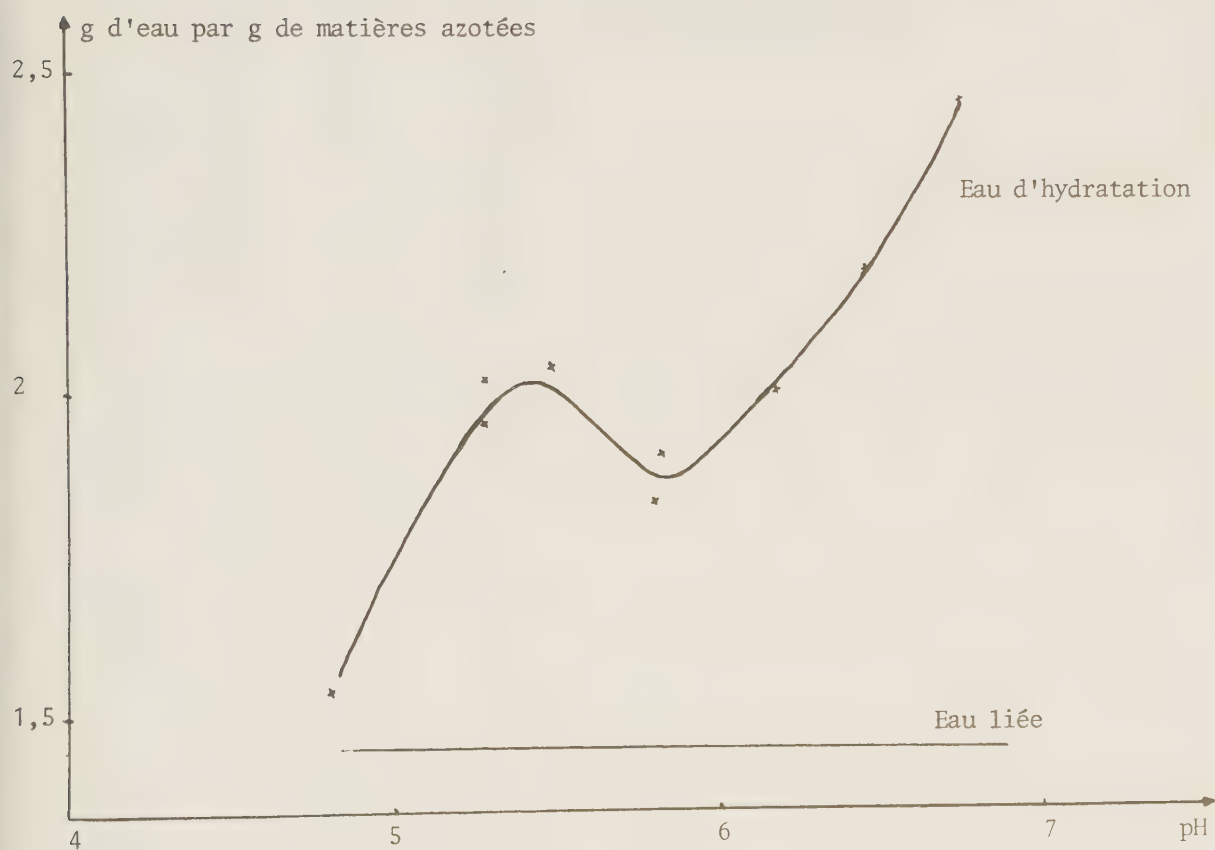


FIG.14 : Hydratation des matières azotées en fonction du pH.

Teneur des laits en matière sèche (g p.100 g)	9,2			13,3			17,7			21,9			25,6		
	68	126	198	68	126	198	68	126	198	68	126	198	68	126	198
Champs centrifuges (en milliers de g)															
Eau d'hydratation (g p.kg de lait)	69,4	62,7	62,9	102,6	94,4	97,1	133,9	127,1	126,2	159,9	161,4	157,2	169,8	189,7	187,3
Calcium (g p.kg de lait)	0,73	0,66	0,66	1,14	0,92	0,94	1,49	1,38	1,41	1,76	1,76	1,60	1,98	2,28	2,18
Calcium p.100 du calcium total	65,3	58,6	58,6	71,4	57,5	59	71,5	66,5	67,7	70,4	70	63,8	67,6	77,8	74,5
Calcium en mg p.g de protéines	27,6	25,6	24,1	28,8	24,3	23,3	29,3	27,5	26,6	28,8	27,8	24	29,7	30	28,5

b) Eau d'hydratation.

En moyenne et à 37° pour un champ centrifuge de 68000 ou de 126000 x g selon la teneur en matière sèche du lait centrifugé, le sédiment fixe de 1,6 à 2 g d'eau par g de produit sec, ce qui correspond à $2,4 \pm 0,15$ g d'eau par g de matières azotées. La figure 12 montre que l'eau d'hydratation est fixée par les protéines sédimentées parmi lesquelles la caséine, qui constitue 95 % de l'azote total du sédiment, joue un rôle prépondérant ; les courbes représentant l'eau d'hydratation en fonction de la teneur du lait en caséine sont des droites, sauf pour les plus fortes teneurs quand le champ centrifuge est insuffisant.

La figure 13 indique que l'accroissement de la teneur en matière sèche du lait entraîne une légère augmentation de l'eau d'hydratation des caséines dans les conditions utilisées.

c) Eau liée.

Les variations de l'eau liée mesurée par cryoscopie sont différentes de celles de l'eau d'hydratation. La figure 13 montre que la quantité d'eau liée par g de protéines totales du lait décroît lentement pour des valeurs de plus en plus élevées de l'extrait sec.

g. d'eau par g. de protéines

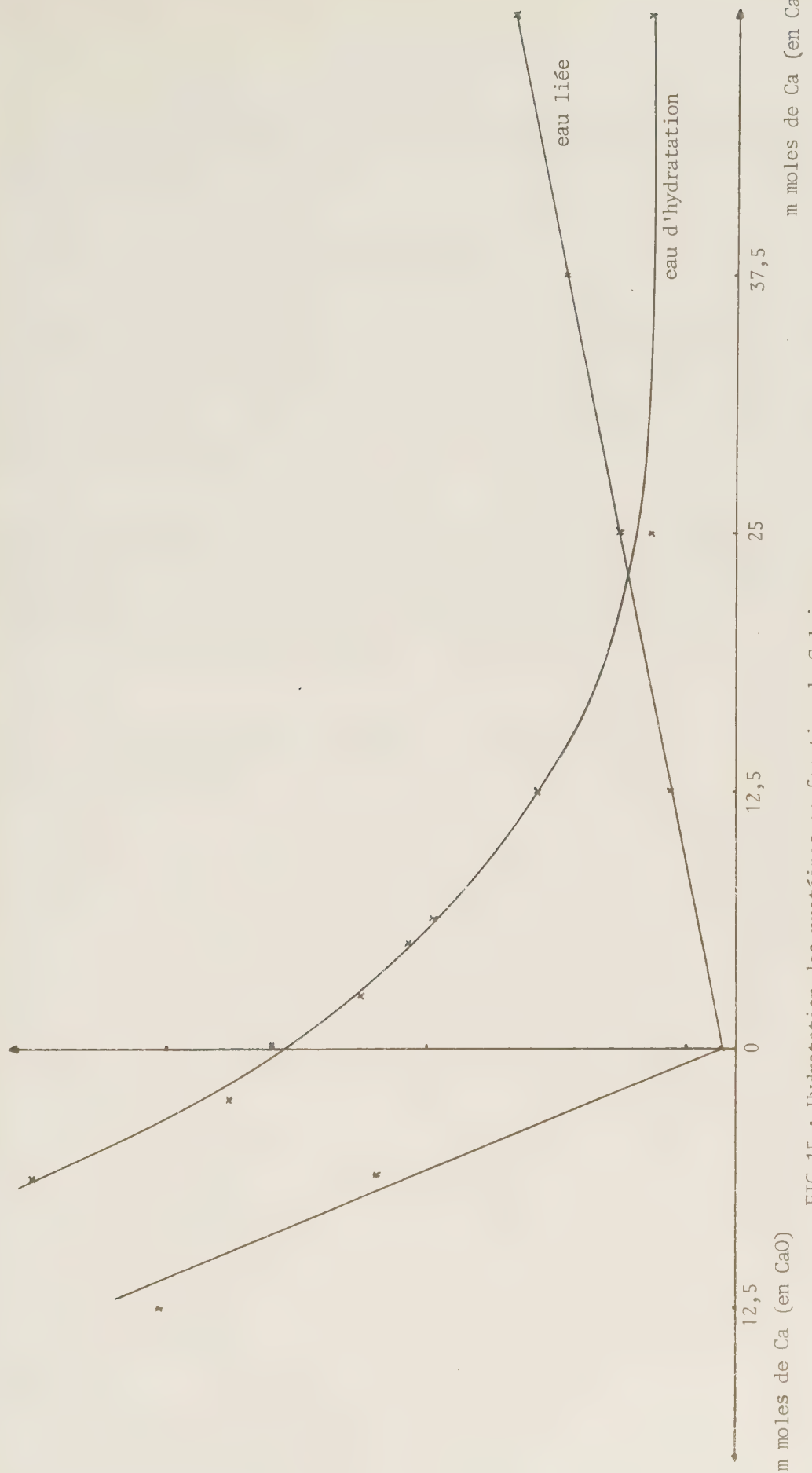


FIG.15 : Hydratation des protéines en fonction du Calcium.

3 - COMPOSITION DU SEDIMENT ET HYDRATATION DU PHOSPHOCASEINATE
EN FONCTION DU PH DU LAIT.

a) Composition du sédiment.

Le tableau 12 montre les variations du poids et de la teneur en azote et en calcium du sédiment en fonction du pH. Il ne se dégage pas des résultats un sens de variation très apparent ; on peut seulement noter une légère augmentation du poids de sédiment et de sa teneur en azote pour des pH voisins de 5,1 - 5,4.

Au contraire, la quantité de calcium du sédiment diminue normalement avec le pH jusque vers pH 5,3. A pH 4,8 , il reste une quantité importante de calcium dans le sédiment, mais il s'agit de calcium apporté par l'eau d'hydratation et non plus de calcium du phosphocaséinate.

TABLEAU 12 - COMPOSITION DU SEDIMENT EN FONCTION DU PH.

pH	Poids sec (en g)	Azote (en g)	Calcium (en g)
6,67	33,75	4,35	0,78
6,46	34,7	4,38	0,77
6,19	33,05	4,38	0,68
6,02	33,05	4,41	0,66
5,83	33,15	4,40	0,50
5,49	35,15	4,39	0,36
5,29	35,35	4,56	0,22
5,10	32,3	4,51	0,20
4,80	33	4,46	0,15

b) Eau d'hydratation.

La quantité d'eau d'hydratation du sédiment diminue rapidement quand le pH décroît de 6,6 à 5,8 - 5,9 comme le montre la figure 14. Entre 5,80 et 5,70 il se produit une remontée de l'eau d'hydratation qui atteint un maximum vers pH 5,4, suivie d'une nouvelle chute. Cependant, comme nous l'avons montré précédemment (TARODO et al 1971) le sédiment obtenu à partir d'un lait acidifié à 4,8 reste assez fortement hydraté : il contient encore 1,5 g d'eau environ par g de protéines.

c) Eau liée.

Les abaisséments cryoscopiques du lait pur et du lait additionné de saccharose augmentent linéairement et parallèlement quand le pH diminue. Il s'ensuit que l'eau liée reste constante quand le pH varie de 6,6 à 4,8. Exprimée par gramme de protéines totales du lait la valeur correspondante est de 1,45 g d'eau liée.

4 - COMPOSITION DU SEDIMENT ET HYDRATATION DU PHOSPHOCASEINATE EN FONCTION DU CALCIUM DU LAIT.

a) Composition du lait et du sédiment.

Les additions de calcium, effectuées à partir de chlorure de calcium ou d'oxyde de calcium, sont toujours réalisées 24 heures avant l'analyse du lait afin que les équilibres physicochimiques soient bien établis.

Quand l'addition est réalisée à l'aide de chlorure de calcium, elle provoque une chute importante du pH. Ainsi un ajout de 50 millimoles de calcium en CaCl_2 provoque une chute de pH de 0,7 unité (tableau 13). Malgré cela la quantité de calcium fixée augmente. Cependant, la proportion de calcium fixé par les caséines par rapport au calcium ajouté total, va en diminuant. La fixation est accompagnée d'un accroissement régulier du poids de sédiment sec recueilli, et pouvant atteindre 20 %.

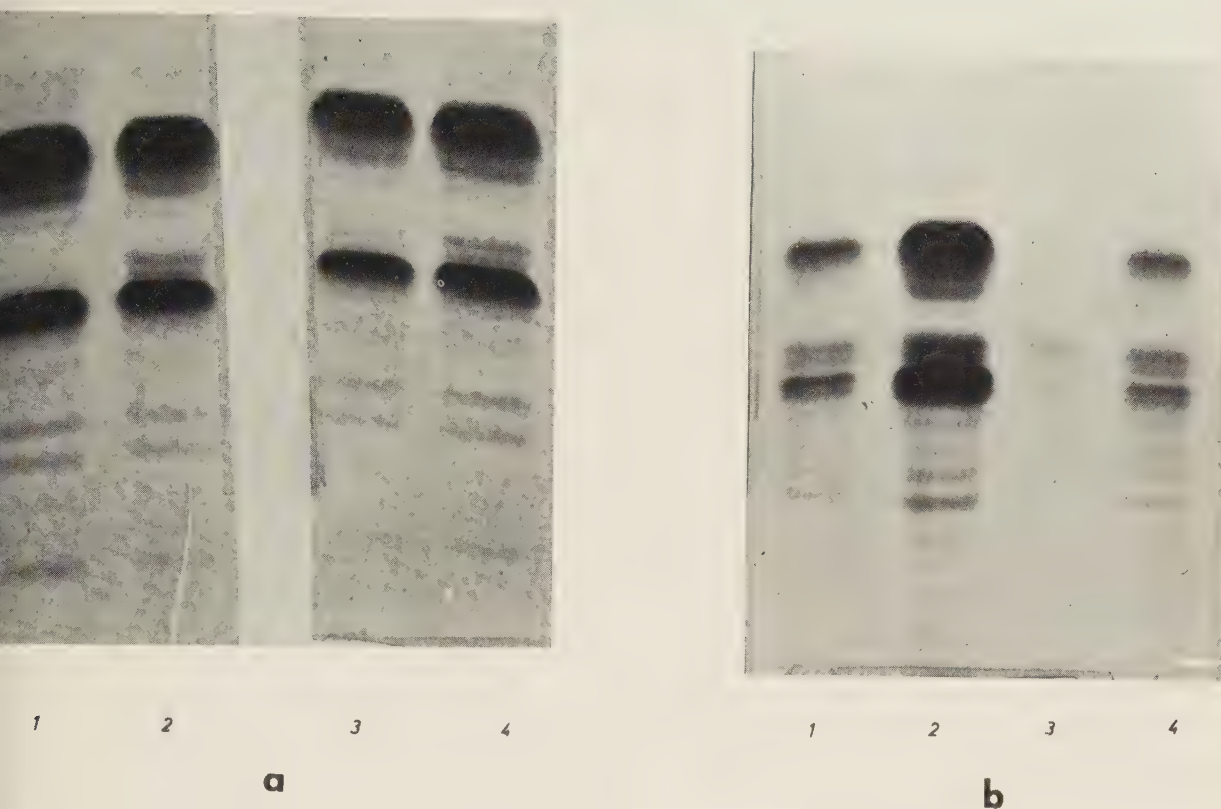


FIG.16

a) Electrophorèse des sédiments (obtenus à 68000 x g) des laits normal et concentré, chauffés ou non.

- 1) Lait écrémé normal non chauffé
- 2) " " " chauffé
- 3) Lait écrémé concentré (2,5 fois) non chauffé
- 4) " " " " chauffé.

b) Electrophorèse des sédiments (obtenus à 68000 et 126000 x g) fractionnés par centrifugation.

- 1) Sédiment obtenu à 68000 x g à partir du surnageant de la centrifugation précédente (17800 x g). Lait normal.
- 2) Sédiment obtenu à 68000 x g à partir du surnageant de la centrifugation précédente (17800 x g). Lait concentré 2,5 fois.
- 3) Sédiment obtenu à 126000 x g à partir du surnageant de la centrifugation précédente (68000 x g). Lait normal.
- 4) Sédiment obtenu à 126000 x g à partir du surnageant de la centrifugation précédente (68000 x g). Lait concentré 2,5 fois.

TABLEAU 13 - REPARTITION DU CALCIUM AJOUTE ENTRE LES FORMES COLLOIDALE ET SOLUBLE ET VARIATION DU POIDS ET DE L'AZOTE DU SEDIMENT SEC RECUEILLI.

Calcium ajouté en millimoles par kg de lait	0	5	12,5	25	50
pH du lait	6,58	6,46	6,26	6,07	5,88
Calcium colloïdal en millimoles par kg de lait	22,35	26,35	29,15	33,1	38
% de calcium ajouté retrouvé sous forme colloïdale	-	79	54,5	42,9	31,3
Sédiment sec en g par kg de lait	33	33,8	34,3	37,9	38,6
Azote du sédiment g par kg de lait	4,32	4,45	4,55	4,57	4,59

Quand on centrifuge un lait privé de phosphate colloïdal par dialyse le poids de sédiment recueilli à 68 000 x g est à peu près la moitié de celui du lait normal correspondant obtenu dans les mêmes conditions (Tableau 14). L'azote sédimenté correspond à 50 % de l'azote caséinique et les protéines correspondantes semblent être des caséines α_s et β exclusivement. L'électrophorèse (figure 16'b) montre que la caséine K se retrouve en majorité dans le surnageant de centrifugation.

TABLEAU 14 - COMPOSITION DU LAIT NORMAL, DU LAIT PRIVE DE PHOSPHATE COLLOIDAL ET DE LEURS SEDIMENTS.

	Lait normal	Lait privé de phosphate colloidal
pH	6,6	6,8
matière sèche g/kg lait	91,5	92,5
Azote g/kg lait	5,16	5,55
Calcium g/kg lait	1,21	0,612
Phosphore g/kg lait	0,87	0,638
Eau liée g/kg lait	47	54,1
Eau liée g/g de protéines totales	1,43	1,54
	Sédiment	Sédiment
Poids sec g/kg lait	33,9	17,6
Azote g/kg lait	4,2	1,97
Eau d'hydratation g/kg lait	68	38
Eau d'hydratation g/g de protéines	2,55	2,68

b) Eau d'hydratation.

On observe une diminution rapide et importante de l'eau d'hydratation quand le calcium ajouté sous forme de chlorure augmente de 0 à 25 millimoles p.1000 de lait. Au delà, l'influence du calcium est négligeable. L'eau d'hydratation décroît de 2,3 à 1,57 g par g de protéines sédimentées, soit de 62 à 44 g par kg de lait (fig.15).

Si l'addition de calcium est effectuée au moyen de Ca O on observe au contraire une augmentation de l'hydratation.

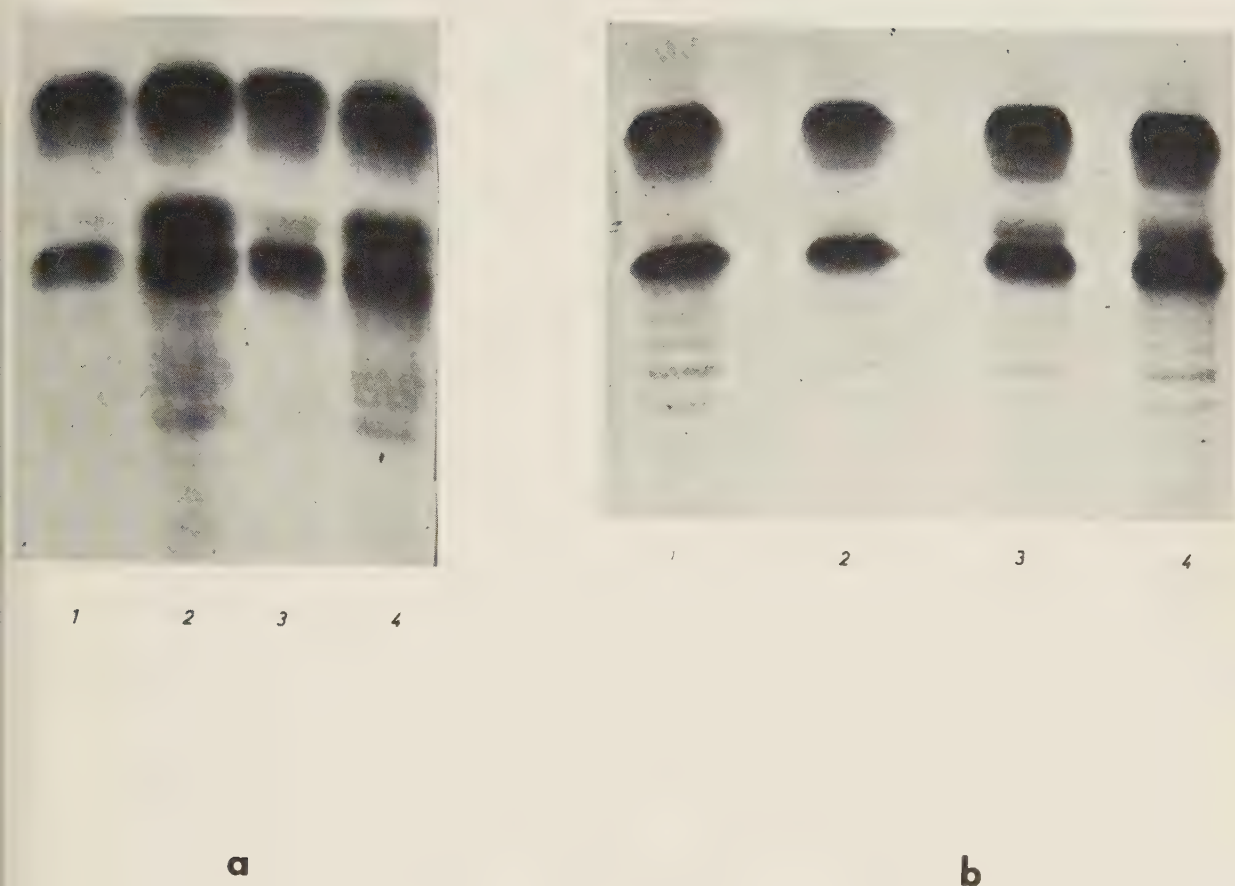


FIG.16'

a) Electrophorèse des sédiments et des surnageants (obtenus à 68000 x g) de laits privés de phosphate colloïdal par dialyse (48 heures et 144 heures) à basse température.

- 1) Sédiment du lait dialysé 48 heures.
- 2) Surnageant du lait dialysé 48 heures.
- 3) Sédiment du lait dialysé 144 heures.
- 4) Surnageant du lait dialysé 144 heures.

b) Electrophorèse des sédiments (obtenus à 68000 x g) de lait normal pasteurisé

- 1) à 75° pendant 30 sec.
- 2) à 75° pendant 2 mn
- 3) à 90° pendant 15 sec.
- 4) à 90° pendant 2 mn.

En fait, il semble que ces variations sont davantage liées aux variations du pH qu'à celles du calcium. Pour une même chute du pH, en effet, la diminution de l'eau d'hydratation est du même ordre de grandeur, qu'il y ait ou non addition de calcium. On passe de 2,45 g à 1,55 g quand le pH varie seul (fig.14), et de 2,3 à 1,57 g quand il varie avec l'addition de CaCl_2 (fig.15).

Dans le cas du lait privé de phosphate colloïdal le tableau 14 montre que la déminéralisation du caséinate entraîne une augmentation de l'eau d'hydratation.

c) Eau liée.

La quantité d'eau liée mesurée par cryoscopie augmente linéairement avec les additions de calcium, quelque soit le sens de variation du pH ; comme l'on a vu précédemment que la variation du pH ne provoque pas un changement de la teneur en eau liée, il s'ensuit que le calcium ajouté a une influence propre. La figure 15 montre aussi que l'augmentation est plus rapide quand le pH augmente parallèlement à la teneur en calcium. On peut remarquer également que le lait normal correspond à la quantité minimale d'eau liée.

Dans le lait privé de phosphate colloïdal le tableau 14 montre que l'eau liée augmente légèrement par rapport au lait normal.

5 - COMPOSITION DU SEDIMENT ET HYDRATATION DU PHOSPHOCASEINATE EN FONCTION DU CHAUFFAGE DU LAIT.

a) Composition du sédiment.

Le tableau 15 montre une augmentation légère mais régulière du poids de sédiment sec recueilli à mesure que la température s'élève et que le chauffage est maintenu plus longtemps. Elle est due à un accroissement des pourcentages d'azote et des minéraux sédimentés.

TABLEAU 15 - COMPOSITION DU SEDIMENT ET HYDRATATION DU PHOSPHOCASEINATE DE LAITS CRUS ET PASTEURISES.

Température et durée du chauffage	témoin	72° 30 sec	72° 2 min.	90° 15 sec	90° 2 min.
Poids de sédiment sec g/kg de lait	30,8	31,4	31,45	32,45	33,5
Azote du sédiment % de l'azote du lait	75	75	76	79	79
Calcium du sédiment mg par g de protéines sédimentées	33,6	35,2	34,8	33,4	34,2
Phosphore du sédiment mg par g de protéines sédimentées	14,2	21	19,9	18,4	18,4
Eau d'hydratation g par g de protéines sédimentées	2,49	2,61	2,60	2,61	2,66
Eau liée g par g de protéines totales	1,42	2,15	2,34	2,59	3,01

b) Eau d'hydratation.

La quantité d'eau d'hydratation exprimée par g de protéines sédimentées augmente légèrement avec le degré de chauffage. L'augmentation maximale est égale à 6,8 %.

c) Eau liée.

La teneur du lait en eau liée augmente beaucoup plus avec le chauffage que la teneur correspondante en eau d'hydratation. Dans les mêmes conditions l'augmentation est supérieure à 110 %. Il faut cependant noter que l'abaissement cryoscopique du lait pur ne varie pratiquement pas (autour de $-0,515^{\circ}$) alors qu'après addition de sucre il augmente régulièrement (de $-1^{\circ},580$ à $-1^{\circ},645$).

6 - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES SEDIMENTS.

Les examens électrophorétiques en gel d'amidon des sédiments d'ultracentrifugation montrent que ces derniers contiennent tous les constituants de la caséine entière : par ordre de mobilité décroissante, les deux groupes de bandes épaisses des caséines α_s et β , puis les bandes fines des caséines K et γ , comme le montre la figure 16. Ceux qui sont obtenus à partir de laits non chauffés, ne contiennent que ces constituants, alors que ceux qui ont été chauffés contiennent en outre la β -Lactoglobuline, visible sous forme de deux bandes fines, migrant un peu en avant de la caséine β (fig.16a et 16'a). Lorsque la concentration du lait a lieu à basse température (moins de 45°), la β -Lactoglobuline n'apparaît pas. Cette protéine forme un complexe avec la caséine K au cours du chauffage et se sédimente avec les caséines ; mais dans le milieu réducteur de l'électrophorèse, les deux substances se séparent.

La figure 16b montre les diagrammes d'électrophorèse des sédiments fractionnés par centrifugation ; quelque soit la vitesse à laquelle chacun a été séparé, ils semblent tous avoir la même composition (le produit 3, résultant de la centrifugation à $126\ 000 \times g$ du surnageant obtenu à $68\ 000 \times g$, était trop peu abondant pour donner une image convenable).

D - ETUDE DU LAIT CONCENTRE.

1 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SUR LE POINT ISOELECTRIQUE.

Le point isoélectrique apparent, considéré comme la valeur du pH au minimum de solubilité de la caséine dans le lait, est voisin de 4,4 - 4,6 pour un lait normal. Cette valeur s'abaisse dans le lait concentré et d'autant plus que la concentration est plus forte.

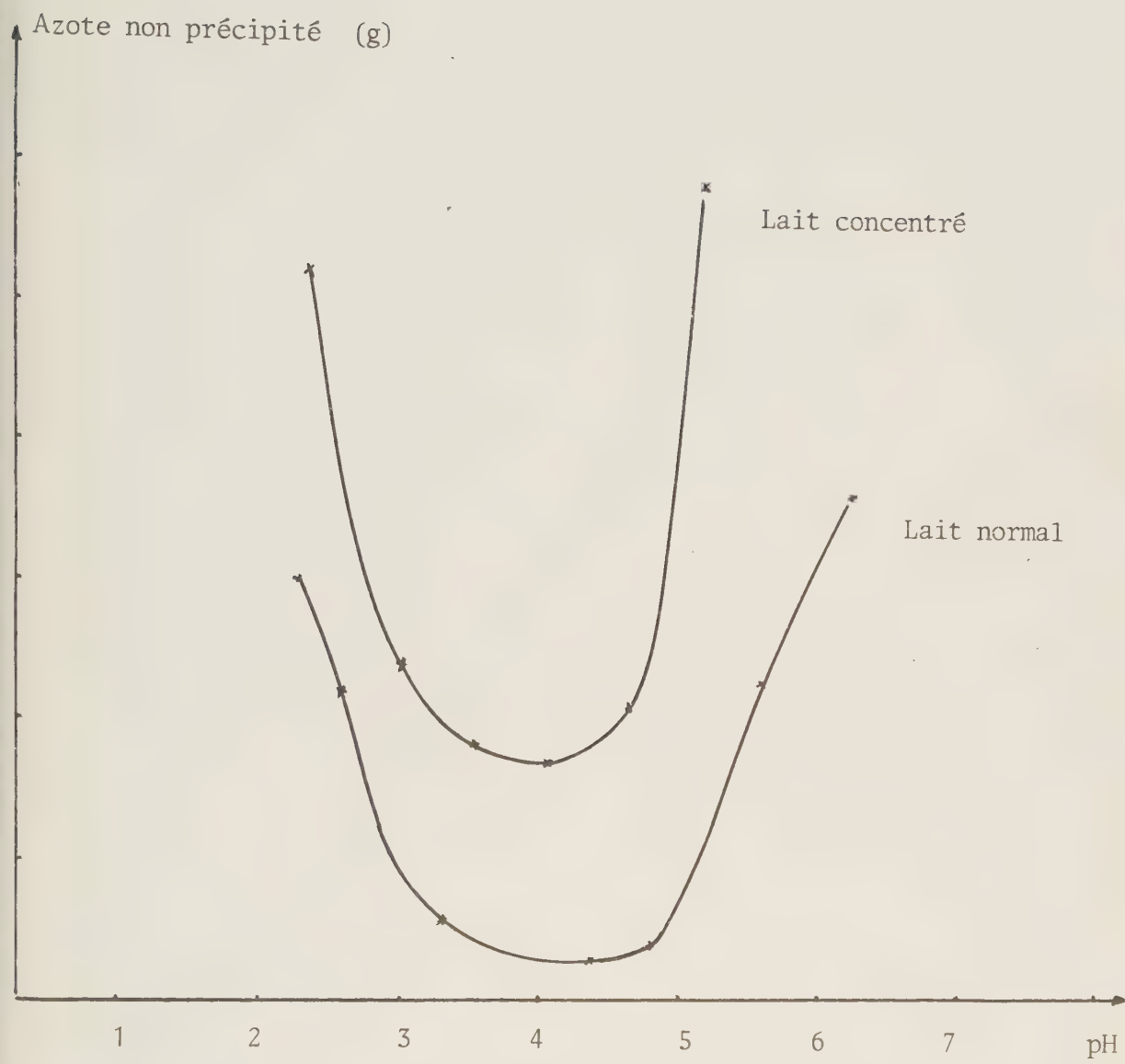


FIG. 17 : Points isoélectriques des laits normal et concentré.

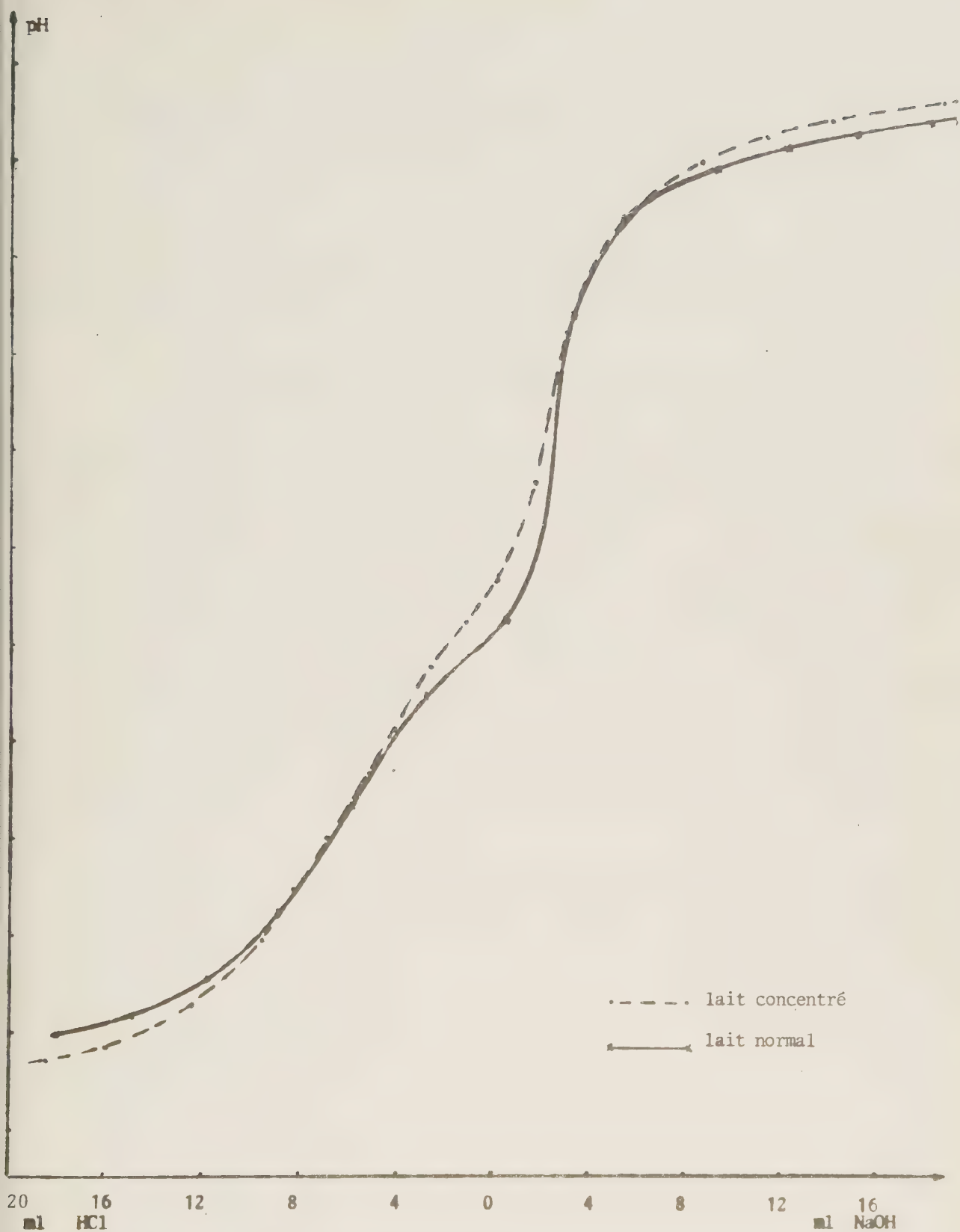


FIG.18 : Courbes de neutralisation.

La figure 17 présente deux courbes obtenues avec un lait normal et le même lait concentré 2,15 fois. On voit que le point isoélectrique est abaissé vers 3,9 - 4,0 ; pour un lait plus concentré (3 fois par exemple), il peut descendre autour de 3,5.

Dans le cas de solutions de caséinate de sodium au contraire, le point isoélectrique est indépendant de la concentration.

2 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION SUR LE POUVOIR TAMPON.

Les courbes de titration des laits présentent des différences selon qu'ils sont plus ou moins concentrés, comme le montre la figure 18 dans laquelle on a tracé les courbes de neutralisation pour la même valeur de l'extrait sec, soit 8,9 %. Au dessous de pH 4 et au dessus de pH 10,5, les quantités d'acide ou de soude nécessaires pour entraîner une baisse ou une augmentation du pH d'une valeur donnée sont relativement plus grandes pour le lait normal que pour le lait concentré, ce qui signifie que le pouvoir tampon du lait concentré est plus faible que celui du lait normal dans ces zones. Des essais témoins ont été faits avec des solutions de caséine dont la concentration allait de 1 à 7,5 %. Les courbes de la figure 19 montrent que l'on peut faire les mêmes observations au dessous de pH 3 et au dessus de pH 7.

Dans la zone de pH comprise entre 5 et 9, les courbes de neutralisation des laits normal et concentré se dissocient fortement. Le point d'équivalence que l'on observe nettement vers 8,3 pour le lait normal n'est plus que très peu apparent dans le cas du lait concentré pour lequel la neutralisation est beaucoup plus régulière. Dans les cas des solutions de caséine on n'observe pas de phénomène semblable. Entre pH 3 et 7 les courbes sont confondues pour toutes les concentrations utilisées.

3 - VARIATIONS DES EQUILIBRES SALINS EN FONCTION DE LA CONCENTRATION.

La concentration du lait par évaporation d'eau entraîne une légère chute du pH de 0,1 à 0,2 unité pour un taux de concentration calculé à partir des teneurs en matière sèche et en matières azotées de l'ordre de 2,5. Une des causes de cette diminution du pH est le déplacement des sels, et en particulier des phosphates de calcium, de la phase soluble vers la phase insoluble constituée par le phosphocaséinate de calcium. On peut supposer par

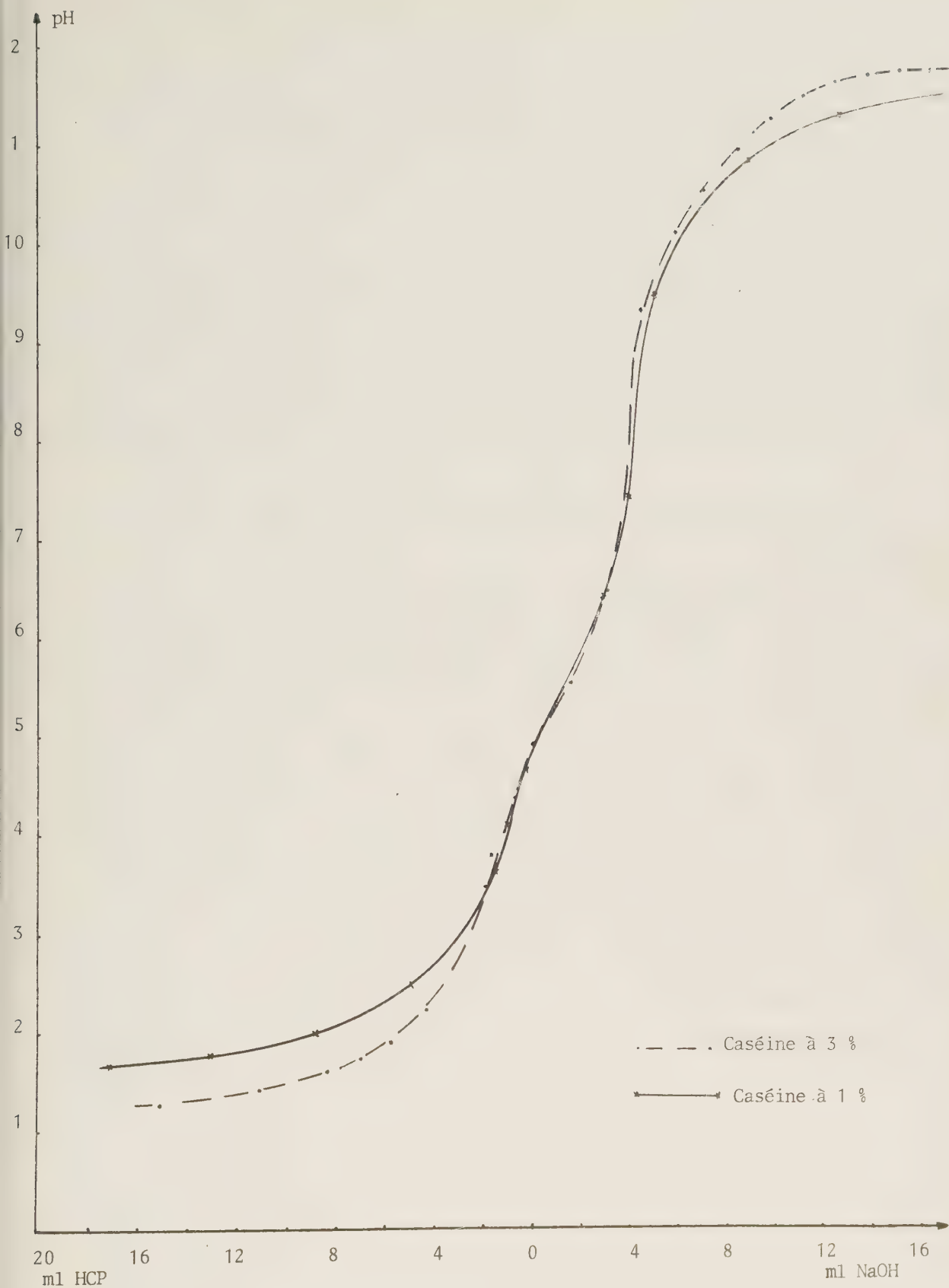


FIG.19 : Courbes de neutralisation.

exemple une transformation de phosphates dicalciques en phosphates tricalciques selon le schéma suivant :



Comme la concentration du lait s'opère généralement à une température moyenne, inférieure à 50° dans les essais réalisés en laboratoire, on peut considérer que le déplacement salin observé lui est dû en totalité. Il peut être relativement important : dans certains cas il atteint et dépasse même 10 % en ce qui concerne le calcium (tableau 16) ; en ce qui concerne le magnésium, les résultats sont moins réguliers.

4 - INFLUENCE DE L'ACIDIFICATION SUR LES EQUILIBRES SALINS.

L'acidification provoque la solubilisation des matières minérales dans le lait concentré comme dans un lait normal. Pour le calcium, la déminéralisation du "phosphocaséinate de calcium" est complète vers pH 4,6 - 4,8, c'est-à-dire pour une valeur de pH proche de celle que l'on obtient avec le lait normal. Dans les deux cas, la solubilisation est assez lente quand le pH baisse de 6,6 à 6,4, plus rapide ensuite jusque vers pH 5, puis plus lente jusqu'à la déminéralisation complète. La courbe de la figure 20 montre l'allure de la solubilisation du calcium dans un lait normal en fonction du pH à température ambiante. On voit qu'il reste une faible quantité de calcium insoluble à pH 4,6. Le calcium est emprisonné dans le précipité de caséine qui commence à se former quand le pH descend vers 5,0. On peut l'éliminer par lavages du précipité. Il est à noter que dans le cas du lait concentré, on n'observe pas de précipitation des caséines quand le pH atteint 4,9 - 4,8.

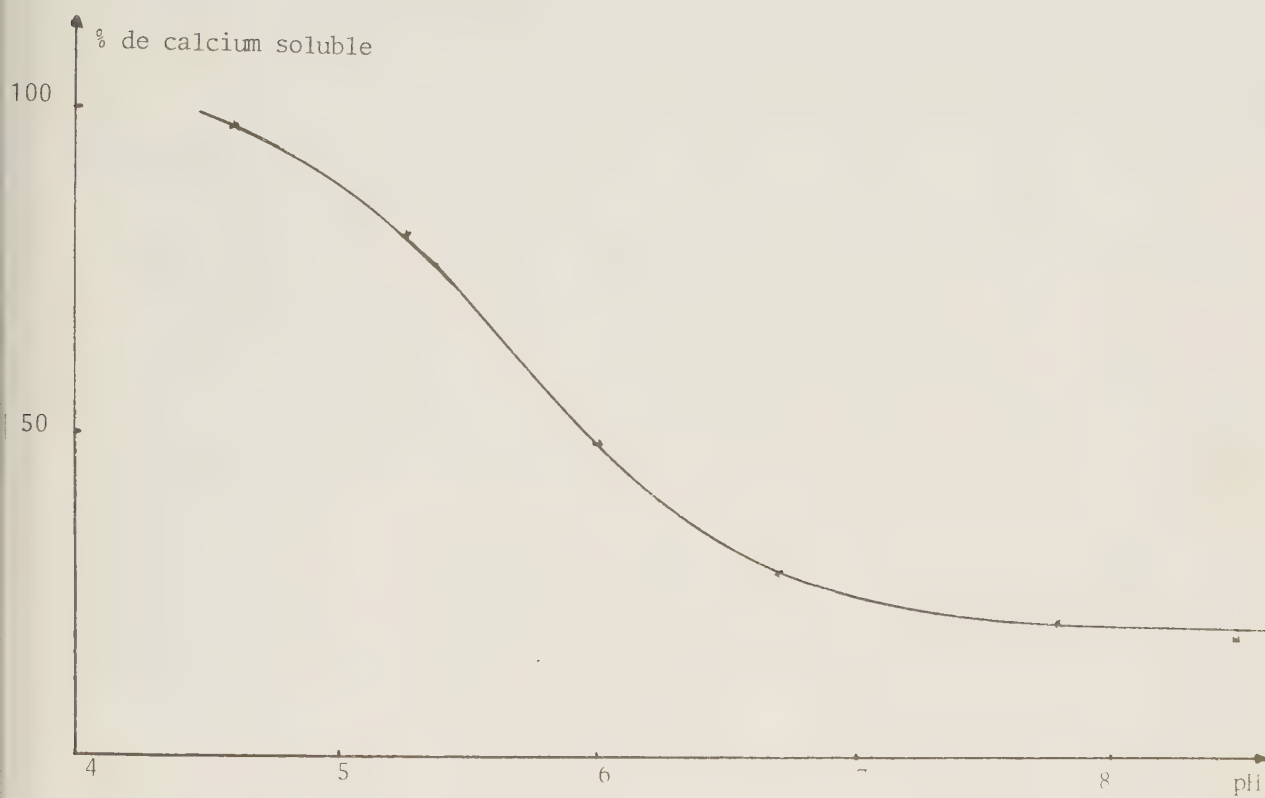


FIG.20 : solubilisation du calcium dans le lait en fonction du pH.

TABLEAU 16 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION ET DE L'ACIDIFICATION DU LAIT SUR LES EQUILIBRES SALINS.

	ES %	pH	Ca total g/l	% de Ca soluble	Mg total g/l	% de Mg soluble
<u>1e série</u>						
Lait normal	8,7	6,73	0,84	35,8	0,082	81,3
Lait concentré	21,9	6,63	2,25	26,7	0,215	72
<u>2e série</u>						
Lait normal	7,9	6,78	0,92	42,3	0,098	63,8
Lait concentré	22,8	6,65	2,45	31,4	0,28	64,3

E - ETUDE DES CAILLES OBTENUS PAR COAGULATION ACIDE.

1 - OBTENTION ET COMPOSITION DES CAILLES ACIDES.

Comme nous l'avons vu au paragraphe I.E, les caillés acides sont obtenus à partir de lait concentré mûré (ou acidifié) jusqu'aux environs de pH 4,9. A ce pH, le lait concentré reste fluide et le refroidissement qu'il subit ensuite permet de le conserver sans que la caséine précipite jusqu'au moment choisi pour la coagulation. Il semble que l'augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal consécutive à la concentration soit la cause de cette stabilité de la caséine dans cette zone de pH.

La technique de coagulation "Paracurd" utilisée ne permet pas d'obtenir directement des caillés lactiques à très faible extrait sec, comme celui des pâtes fraîches conventionnelles que l'on trouve actuellement sur le marché, soit 11,5 à 13,5 %, avec des taux de matière sèche dans les sérums de l'ordre de 5,5 à 6,5 %. Le tableau 17 montre que le caillé paracurd, obtenu à partir de lait concentré à 22-24 % d'extrait sec, a un taux de matière sèche

voisin de 15 % et le sérum correspondant un extrait sec voisin de 7 à 8 %. Le pH du caillé est souvent proche de 4,8 - 4,9 ; il ne descend pas à 4,6 comme pour le caillé normal et cela constitue certainement une des causes du comportement différent des pâtes paracurd qui sont beaucoup plus minéralisées que les caillés normaux comme le montre le tableau 18. De plus, pour le calcium et le magnésium, on constate qu'une certaine quantité de ces cations est fixée à nouveau par le caillé, après avoir été solubilisée au cours de l'acidification du lait et vraisemblablement refixée par le phosphocaséinate au cours du stockage à basse température.

TABLEAU 17 - COMPOSITION DES CAILLES LACTIQUES ET TENEUR EN MATIERE SECHE DU LAIT ET DU SERUM.

	Caillé			Extrait sec %	
	Extrait sec %	pH	Lactose %	Lait	Sérum
I					
Paracurd	15,0	-	3,92	22,2	7,22
caillé normal	12,3	-	3,30	8,73	5,84
II					
Paracurd	15,3	5,0	4,21	23,4	7,21
caillé normal	13,1	4,52	3,47	9,05	6,18

TABLEAU 18 - MINERALISATION DES CAILLES ACIDES (g/kg).

	Ca		Mg		Na		K	
	total	refixé	total	refixé	total	refixé	total	refixé
I								
Paracurd	1,38	0,25	0,10	0,012	0,50	0	1,40	0
caillé normal	0,99	0	0,08	0	0,36	0	1,40	0
II								
Paracurd	1,64	0,46	0,12	0,022	0,46	0	1,80	0
caillé normal	1,15	0	0,09	0	0,36	0	1,56	0
III								
Paracurd	1,99	0,97	0,13	0,036	0,42	0	1,68	0

On voit dans les tableaux 18 et 19 que la quantité de calcium "refixée" dans la pâte représente une proportion importante du calcium total (10 à 50 %) ; la quantité de magnésium correspondante est plus faible mais non négligeable (9 à 30 %). Les autres cations ne sont pas du tout refixés, comme cela se produit avec les caillés normaux dans lesquels tous les minéraux proviennent du sérum.

Le tableau 19 montre en outre qu'il existe une corrélation entre l'extrait sec du lait initial et la proportion de cations "refixés". La haute valeur obtenue pour le n° 4 est due en partie à une teneur en matière sèche très élevée de la pâte.

TABLEAU 19 - FIXATION DU CALCIUM ET DU MAGNESIUM DANS LES CAILLES PARACURD.

Caillé N°	ES du lait %	ES du caillé %	% de Ca et de Mg refixés	
			Ca	Mg
1	17,1	16,7	11	8,6
2	21,9	16,1	18,7	15,2
3	23,4	15,3	28	18,3
4	24,1	23,7	48	27,6

3 - VARIATIONS DE L'HYDRATATION DES PROTEINES DANS LES LAITS CONCENTRES MATURES.

Nous avons analysé les sédiments de centrifugation de laits différemment concentrés (de 117 à 202 g par kg), et acidifiés jusqu'à un pH compris entre 5,28 et 4,81, limites entre lesquelles il faut amener le lait pour obtenir une coagulation correcte.

Les résultats montrent que le poids de sédiment ne varie pratiquement pas quand le pH est abaissé de 5,2 à 4,8 (Tableau 20). Pour un lait donné, le pourcentage d'azote dans le sédiment par rapport à l'azote total augmente quand le pH diminue. De plus, alors qu'aux pH habituels des laits normaux et concentrés (6,6 - 6,4), la quantité d'azote retrouvé dans le sédiment diminue avec l'accroissement de la concentration du lait, pour les pH bas de 5,2 à 4,8 au contraire l'azote sédimenté augmente avec la concentration. En ce qui concerne le calcium sédimenté, le tableau 20 montre qu'il diminue fortement de pH 5,2 à pH 4,8, ce qui peut compenser l'augmentation de poids due à l'azote, et que, pour chaque pH, les laits les plus concentrés ont toujours des sédiments plus minéralisés.

Comme pour le poids de sédiment, les variations de l'eau d'hydratation sont très faibles quand le pH décroît de 5,2 à 4,8. Il semble cependant qu'elle diminue légèrement à mesure que le pH s'approche de 4,8. Pour ces pH,

la concentration du lait ne semble avoir aucune action sur l'hydratation des protéines.

TABLEAU 20 - COMPOSITION DES SEDIMENTS DE LAITS ACIDIFIES A DIFFERENTS PH.

Extrait sec %		117,53	151,94	179,44	202,45
Poids de sédiment sec g	pH 5,2	38,3	53,3	66,2	76,8
	pH 5,0	38,05	52,3	65	77,2
	pH 4,8	38,1	52,9	64,5	75
Azote du sédiment g	pH 5,1	4,93	6,65	7,97	8,98
	pH 5,0	5,17	6,8	7,9	9,14
	pH 4,8	5,15	6,84	8,01	9,08
Calcium du sédiment mg	pH 5,2	410	765	804	847
	pH 5,0	248	428	535	696
	pH 4,8	159	312	535	610
Eau d'hydratation g/g de protéines	pH 5,2	1,77	1,80	1,76	1,70
	pH 5,0	1,61	1,69	1,74	1,74
	pH 4,8	1,62	1,69	1,59	1,65

3 - VARIATION DE L'HYDRATATION DES CASEINES DANS LE CAILLE EN FONCTION DE LA DILUTION DU LAIT CONCENTRE.

Dans le procédé Paracurd on dilue le lait concentré maturé au moment de la coagulation par un apport déterminé d'eau chaude. Cette dilution a pour but d'obtenir des pâtes à extrait sec peu élevé, de l'ordre de 15 à 16 %. Cependant, on ne ramène jamais l'extrait sec du lait à ce qu'il était avant concentration afin de bénéficier des propriétés particulières du lait concentré qui conduisent, essentiellement, à une augmentation de rendement. En pratique la dilution est calculée pour que le lait écrémé dilué ait un extrait sec compris entre 90 et 110 g par kg.

Le tableau 21 montre que la diminution du taux de reconstitution, c'est à dire l'augmentation de la dilution du lait, entraîne la diminution de l'hydratation des matières azotées et de leur minéralisation.

TABLEAU 21 - INFLUENCE DU TAUX DE RECONSTITUTION SUR LA COMPOSITION DES CAILLES OBTENUS.

Teneur en matière sèche du lait concentré acidifié : 217,75 g/kg			
Taux de reconstitution	120	100	80
pH du caillé	4,9	4,86	4,76
Calcium g par kg de pâte	1,86	1,60	1,23
Eau d'hydratation en g par g de protéines	1,47	1,43	1,37
Calcium en mg par g de protéines	49,5	44,5	31,4

4 - EFFETS DE L'HOMOGENEISATION SOUS PRESSION SUR LES PROPRIETES PHYSIQUES DES PATES CONVENTIONNELLES ET PARACURD.

L'homogénéisation du caillé Paracurd à 17 % d'extrait sec, lorsqu'elle est pratiquée à température assez basse, vers 15°, donne un produit dont la fermeté est insuffisante (indice inférieur à 20) ; on obtient la même valeur au pénétromètre quelle que soit la pression. A des températures plus élevées, la fermeté du caillé simplement lissé (A₀, fig.21) reste basse et varie peu ; par contre, la fermeté du caillé homogénéisé sous pression s'accroît beaucoup et ceci d'autant plus que la pression est plus forte ; c'est ce que montre la figure 21 avec des pressions de 200 (A.200) et 300 kg par cm² (A.300).

Le caillé normal à 12 % d'extrait sec a un comportement très différent ; la fermeté diminue avec la pression d'homogénéisation ; le caillé se liquéfie vers 200 kg/cm². Un simple lissage est suffisant pour avoir une fermeté convenable (courbes A₁ et B₁, fig.22) ; mais la température a un effet marqué ; la fermeté passe par un maximum, vers 25°.

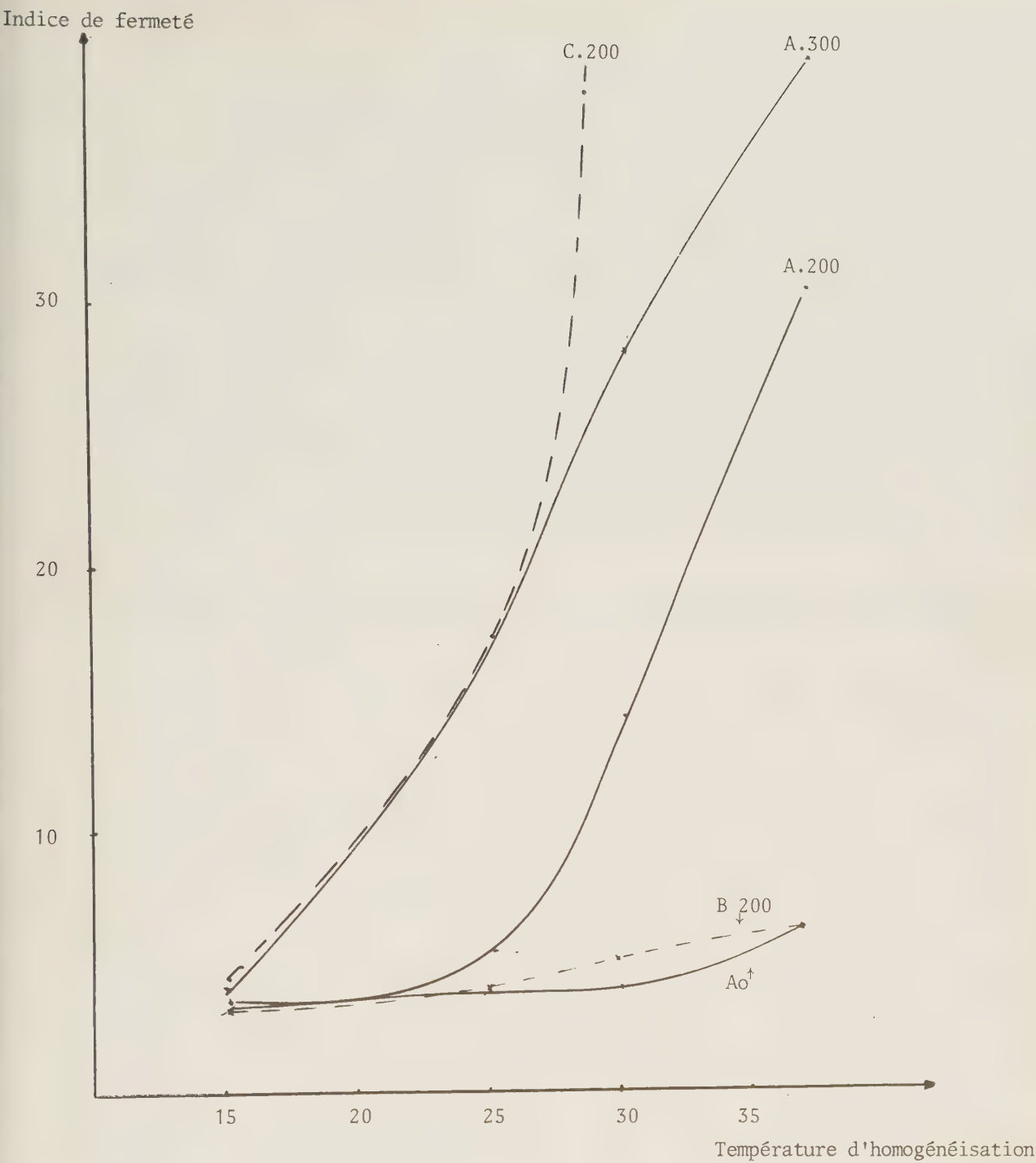


FIG.21 : Variation de la fermeté des caillés PARACURD en fonction de la pression d'homogénéisation.

Le brassage du caillé avant stockage en chambre froide ne provoque pas de modification notable de fermeté avec le caillé normal lissé (figure 22, courbes A et B) ; par contre, il diminue la fermeté du caillé Paracurd (figure 21, courbe B 200) et amène souvent une destabilisation partielle du produit qui prend un aspect granuleux et mat, mais sans exsudation de sérum.

La consistance du caillé Paracurd dépend non seulement de l'homogénéisation et de la température, mais aussi de l'extrait sec. Le tableau 22 montre l'influence de l'extrait sec sur la fermeté avant et après conservation à basse température. On remarque par exemple, qu'il faut un extrait sec de 18 % pour avoir un indice de fermeté de 10,3 à la pression de 50 kg/cm², mais que 17 % suffisant à la pression de 200 kg/cm² pour le même indice (10,7).

TABLEAU 22 - INFLUENCE DE L'EXTRAIT SEC SUR LA FERMETÉ DES PÂTES PARACURD.

	ES %	Indice de fermeté à		
		50 kg/cm ²	200 kg/cm ²	300 kg/cm ²
Caillé n°1 avant conservation	18,07	10,3	17,8	27
Caillé n°1 après conservation	"	31,2	35,7	52,6
Caillé n° 2 avant conservation	17,06	4,74	10,7	32,2
Caillé n° 2 après conservation	"	7,4	14,1	47,6
Caillé n° 3 avant conservation	16,11	3,78	8,34	18,5
Caillé n° 3 après conservation	"	4,48	15,6	26,3

La conservation au froid augmente la fermeté des caillés. L'augmentation est forte avec les caillés normaux lissés comme le montrent les courbes A₁ et B₁ de la figure 22 ; elle est plus forte encore pour les pâtes Paracurd : courbe C 200 de la figure 21.

ndice de fermeté

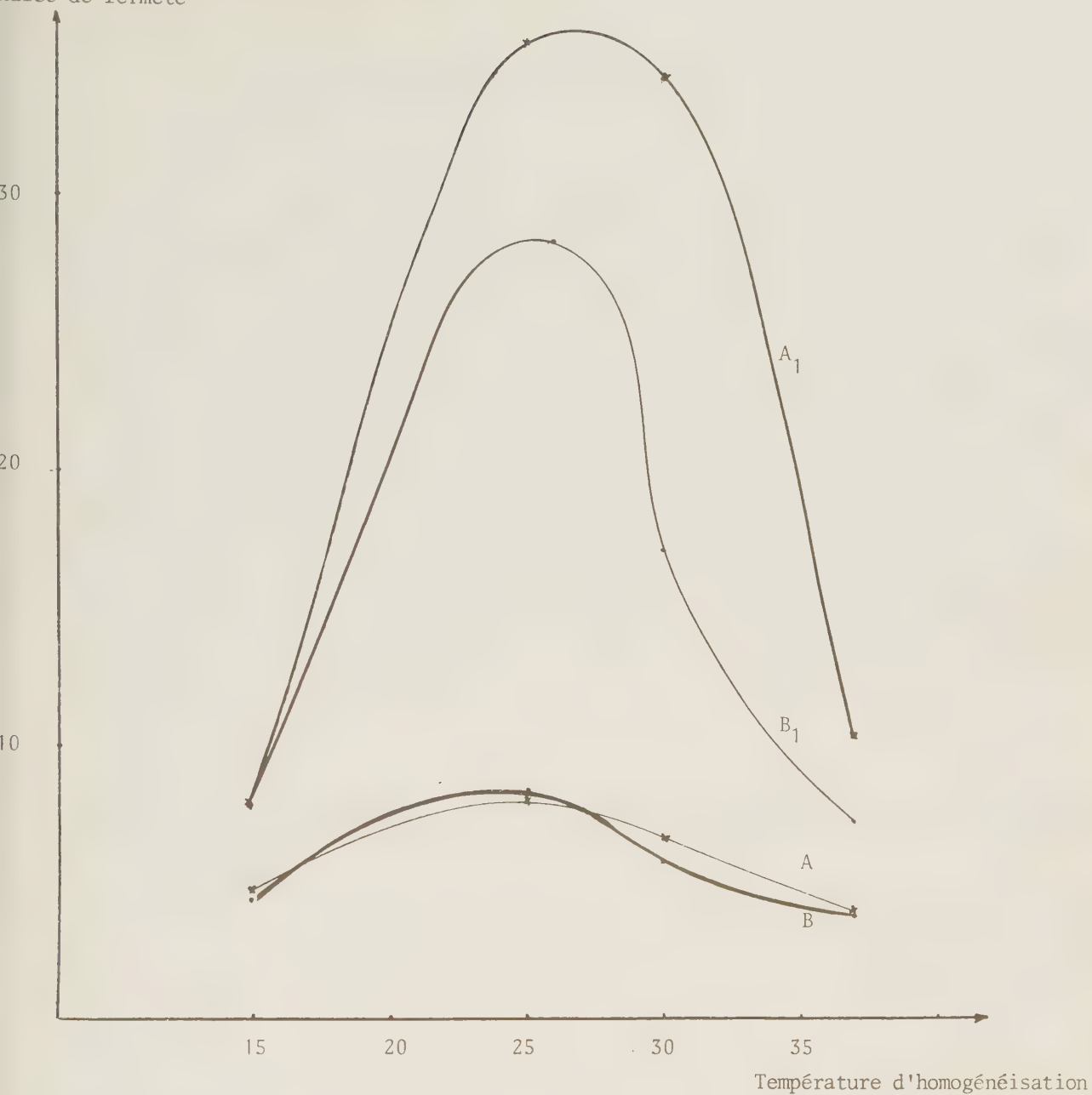


FIG.22 : Fermeté des caillés normaux en fonction de la température, du stockage à basse température et du brassage

- A caillé lisse
- B caillé A agité
- A₁ caillé A conservé 12h à 5°C
- B₁ caillé A₁ agité.

5 - EFFETS DE L'ADDITION D'EAU A UNE PATE PARACURD DE FORT EXTRAIT SEC.

A partir d'un lait concentré à 240,6 g de matière sèche par litre, on a fabriqué une pâte Paracurd (ES : 15,2 %) et une pâte paracurd très égouttée (ES : 23,66 %). Cette dernière est ensuite diluée à l'eau pour donner des pâtes à extrait sec variable : 17,5 - 14 - 11 %. Ceci entraîne, par rapport à la pâte Paracurd habituelle, un appauvrissement moins grand pour le calcium que pour le lactose, le sodium, le potassium et même le magnésium, comme le montre le tableau 23. Cette différence est une conséquence de la "refixation" partielle du calcium sur la pâte, observée précédemment. Malgré cet appauvrissement, les pâtes diluées sont, après homogénéisation sous 300 kg de pression, beaucoup plus fermes que les pâtes paracurd habituelles, même si leur extrait sec est nettement inférieur. Ainsi la pâte à 11 % d'extrait sec est à peu près 3 fois plus ferme que la pâte Paracurd à 15,2 % (tableau 23).

TABLEAU 23 - COMPOSITION ET FERMETE DES PATES PARACURD A DIFFERENTS EXTRAITS SECS.

	ES %	Lactose g/kg	Minéraux g/kg				Rapport lactose/ ES	Indice de fermeté*
			Ca	Mg	Na	K		
e Paracurd tuelle	15,2	51,3	1,55	0,13	0,52	1,98	33,8	3,33
e Paracurd ne	23,66	42,7	1,99	0,13	0,42	1,68	18	∞
e Paracurd uée à l'eau***:								
1	17,5	29,3	1,37	0,10	0,30	1,53	16,7	83,4
2	14	24,3	1,12	0,08	0,25	1	17,4	10,7
3	11	18,5	0,92	0,06	0,19	0,8	16,8	9,6

après homogénéisation sous 300 kg/cm²
non mesurable par le pénétromètre utilisé
proviennent de l'addition d'eau à la pâte riche.

Cet accroissement de la fermeté est en relation avec la diminution de la proportion relative d'extrait sec du sérum dans la pâte. On voit dans le tableau 23 que, lorsque cette proportion, représentée par le rapport lactose/extrait sec, diminue, la fermeté des pâtes est augmentée même si leur extrait sec est faible.

De plus, les pâtes obtenues peuvent être brassées après homogénéisation sans qu'il y ait destabilisation contrairement aux pâtes Paracurd obtenues sans addition d'eau.

E - ETUDE DE LA COAGULATION ENZYMATIQUE.

1 - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DU TEMPS DE CONSERVATION DU LAIT.

Nous avons étudié l'influence du stockage à basse température sur du lait cru ou pasteurisé conservé 24 h en chambre froide entre 0 et 4°C. Le tableau 24 montre que la conservation entraîne une augmentation sensible des temps de floculation thrombélastographiques (r), et un accroissement beaucoup plus faible du paramètre k qui indique avec quelle vitesse s'affermi le coagulum, quelle que soit la température de coagulation.

TABLEAU 24 - INFLUENCE DU STOCKAGE A BASSE TEMPERATURE SUR LA COAGULATION DU LAIT.

Température de coagulation °C	r, lait non stocké	r, lait stocké	k, lait non stocké	k, lait stocké
30	9 mn 09 sec	9 mn 48 sec	6 mn 45 sec	7 mn 30 sec
37	7 mn	7 mn 33 sec	3 mn 48 sec	4 mn 03 sec
40	6 mn 36 sec	7 mn 18 sec	3 mn 54 sec	4 mn
45	6 mn 36 sec	7 mn	4 mn 06 sec	4 mn 06 sec

Pour un lait pasteurisé à 90° pendant 1 mn, l'écart observé entre les temps de floculation est beaucoup plus important. A la température de 30°, il atteint plus de 20 %. De plus, le caillé provenant du lait conservé est

beaucoup plus mou que celui du même lait avant stockage (fig.23).

2 - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE COAGULATION.

Nous avons fait varier la température de coagulation de 2 en 2 degrés, de 28 à 48, et nous avons utilisé du lait cru, pasteurisé et reconstitué.

Le tableau 25 indique les variations des paramètres r et k dans le cas du lait cru. Comme pour les laits pasteurisés et reconstitués, ces paramètres diminuent au fur et à mesure que la température augmente jusqu'à 39° environ. On constate ensuite la présence d'un palier entre 39 et 45° ; au delà de 45°, les paramètres r et k augmentent rapidement et le coagulum devient de plus en plus mou (fig.24 et 25). Au dessus de 50° la coagulation est très lente et dans les conditions utilisées, on ne peut plus parler de caillé.

Dans le cas du lait pasteurisé, les temps de floculation et les temps nécessaires pour que le tracé s'écarte de 20 mm (k), sont nettement plus importants que pour le lait cru (tableau 25). De plus, la figure 24 montre que la pasteurisation raccourcit le palier au cours duquel la température de coagulation a peu d'action.

TABLEAU 25 - VARIATIONS DES PARAMETRES r ET k EN FONCTION DE LA TEMPERATURE DE COAGULATION DE LAITS CRUS ET PASTEURISES.

Température	r lait cru	r lait pasteurisé	k lait cru	k lait pasteurisé
26	13 mn 30 sec	17 mn 30 sec	15 mn 30 sec	29 mn 15 sec
28	11 - 06 -	13 - 27 -	10 - 12 -	17 - 48 -
30	9 - 54 -	11 - 36 -	7 - 45 -	11 - 30 -
32	9 - - -	10 - 06 -	6 - 06 -	8 - 24 -
34	8 - 18 -	9 - 30 -	4 - 57 -	7 - 30 -
36	7 - 42 -	8 - 57 -	4 - 39 -	6 - 45 -
38	7 - 18 -	8 - 54 -	4 - 15 -	6 - - -
40	7 - 06 -	8 - 24 -	3 - 54 -	5 - 33 -
42	7 - 06 -	8 - 06 -	4 - 03 -	6 - 12 -
44	7 - 06 -	8 - 24 -	4 - 45 -	6 - 54 -
46	7 - 21 -	9 - 33 -	5 - 30 -	9 - 21 -
48	8 - 36 -	12 - 30 -	9 - 30 -	26 - 12 -

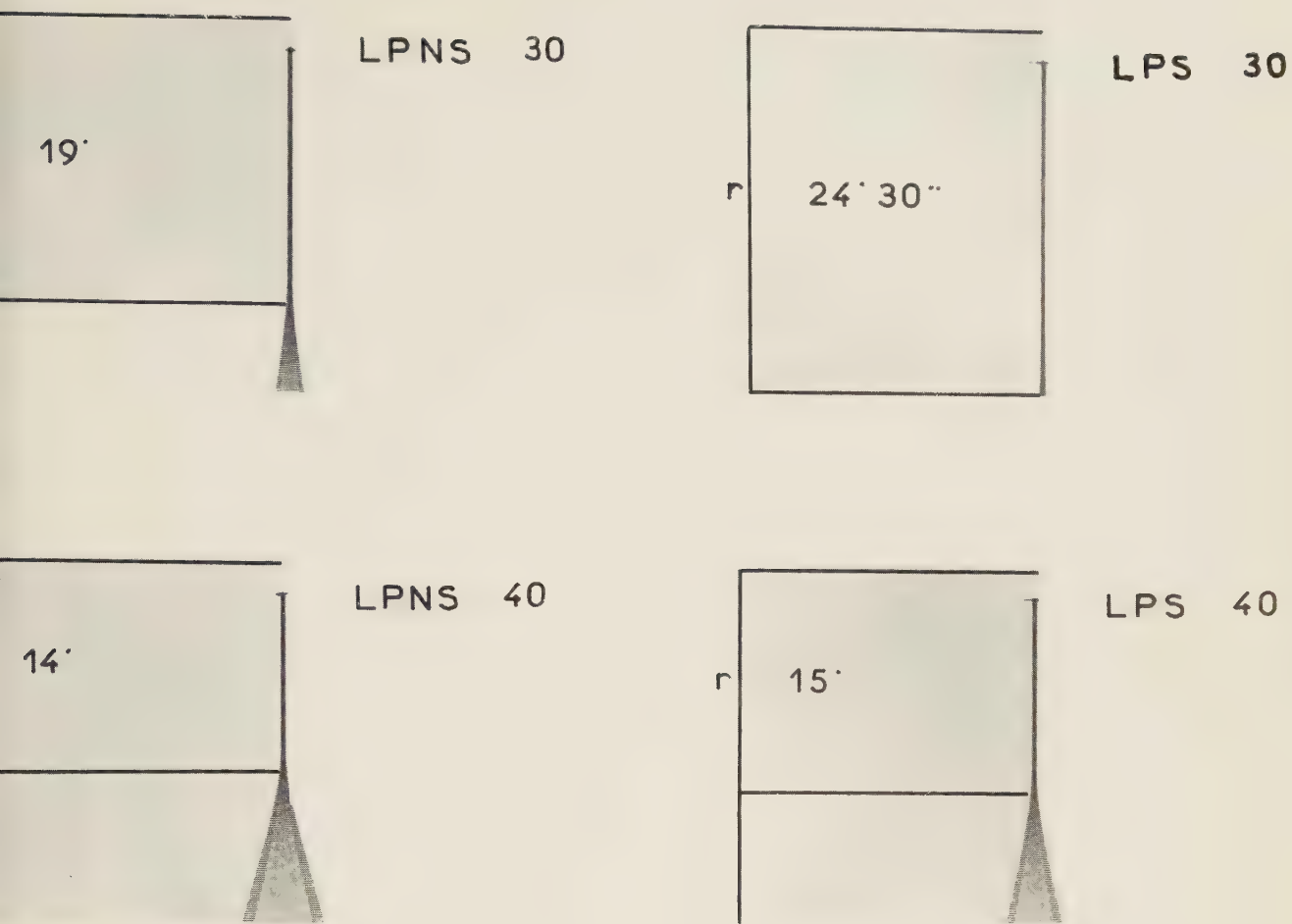


FIG. 23 : Action du stockage après pasteurisation à 90°C

LPNS : lait pasteurisé non stocké, coagulé à 30 ou 40°.

LPS : lait pasteurisé stocké 24h à 4°, coagulé à 30 ou 40°.

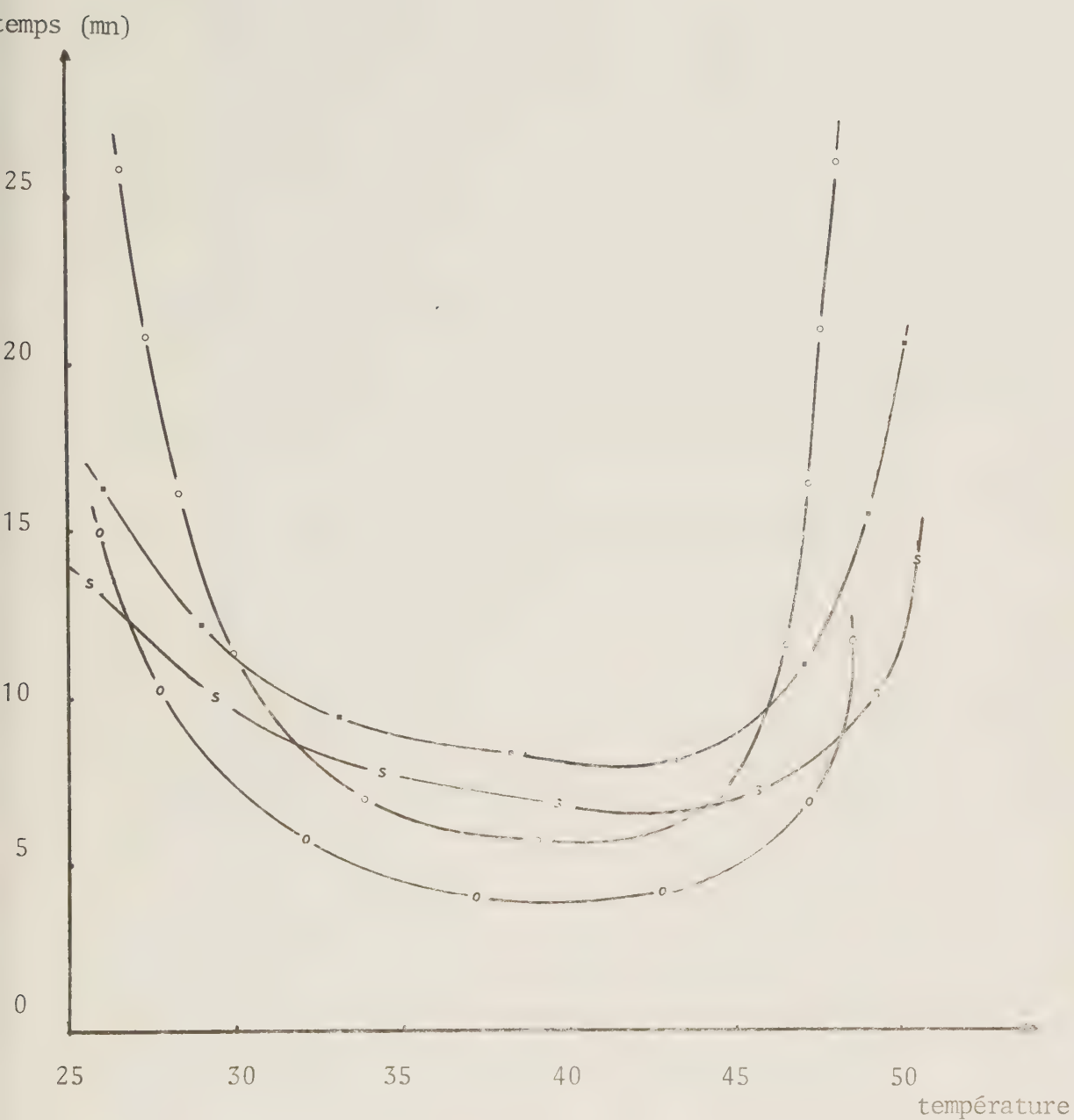


FIG.24 : Evolution des temps de floculation et de la fermeté du coagulum en fonction de la température de coagulation.

- r : lait cru
- o--o k : lait cru
- o--o r : lait pasteurisé
- s--s k : lait pasteurisé

Pour étudier l'influence de la température de coagulation sur la rétraction du coagulum nous avons utilisé du lait reconstitué acidifié jusqu'à pH 5,4 pour obtenir des thrombodynamogrammes courts ; nous verrons en effet que la rétraction du coagulum devient plus rapide quand le pH diminue. La figure 26 montre que les variations de la température de coagulation (de 24 à 48°C) ont une influence très sensible sur la rétraction du tracé. A 24° le début de la rétraction intervient 110 mn après la floculation ; à des températures voisines de 40°, ce temps n'est plus que de quelques minutes. Les propriétés mécaniques du coagulum, mesurées par A_m diminuent à mesure que la température augmente. L'augmentation de la température accélère donc l'apparition du maximum de fermeté mais elle provoque en même temps une diminution rapide de cette dernière.

3 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM.

L'addition de calcium sous forme de $CaCl_2$ entraîne des variations importantes du pH du lait ; l'addition de 2,8 g de $CaCl_2$ (1 g en Ca^{++}) entraîne une baisse de pH de plus de 0,5 unité. Dans ces conditions on observe une diminution très rapide des temps de floculation et des paramètres k , quelque soit le lait utilisé. Quand on maintient le pH constant, les variations dues au calcium seul sont moins nettes mais toujours significatives.

Pour étudier l'influence du calcium sur l'évolution du coagulum nous avons maintenu le pH constant et égal à 5,5. Dans ces conditions, le calcium ajouté variant de 0,45 à 6,23 mM, le temps de floculation est très court et décroît de 1 mn 06 à 1 mn et la figure 27 montre que la rétraction du coagulum est d'abord retardée par l'augmentation de la teneur en calcium, puis elle semble se stabiliser à partir de 3,5 mM. Les propriétés mécaniques du coagulum, représentées par A_m , évoluent dans le même sens, mais les variations sont très faibles, de 79 à 83 mm.

4 - INFLUENCE DE L'ACIDITE.

La baisse du pH du lait entraîne une diminution importante des temps de floculation. Parallèlement le paramètre k est aussi diminué comme le montre le tableau 26. La diminution des deux paramètres est très rapide jusqu'à pH 6 puis devient plus lente quand l'acidification se poursuit.

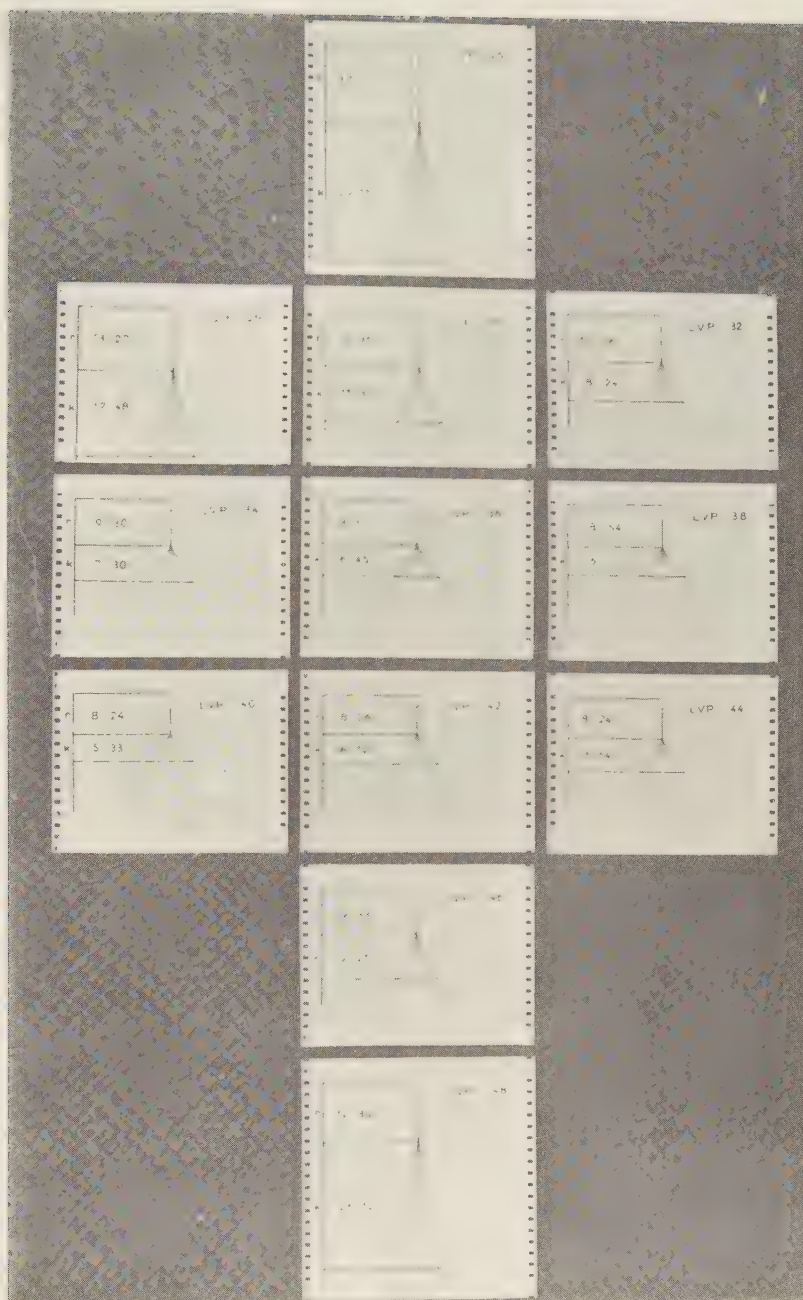


FIG. 25 : Influence de la température sur l'évolution des propriétés mécaniques du coagulum.

L.V.P. : lait de vache pasteurisé.

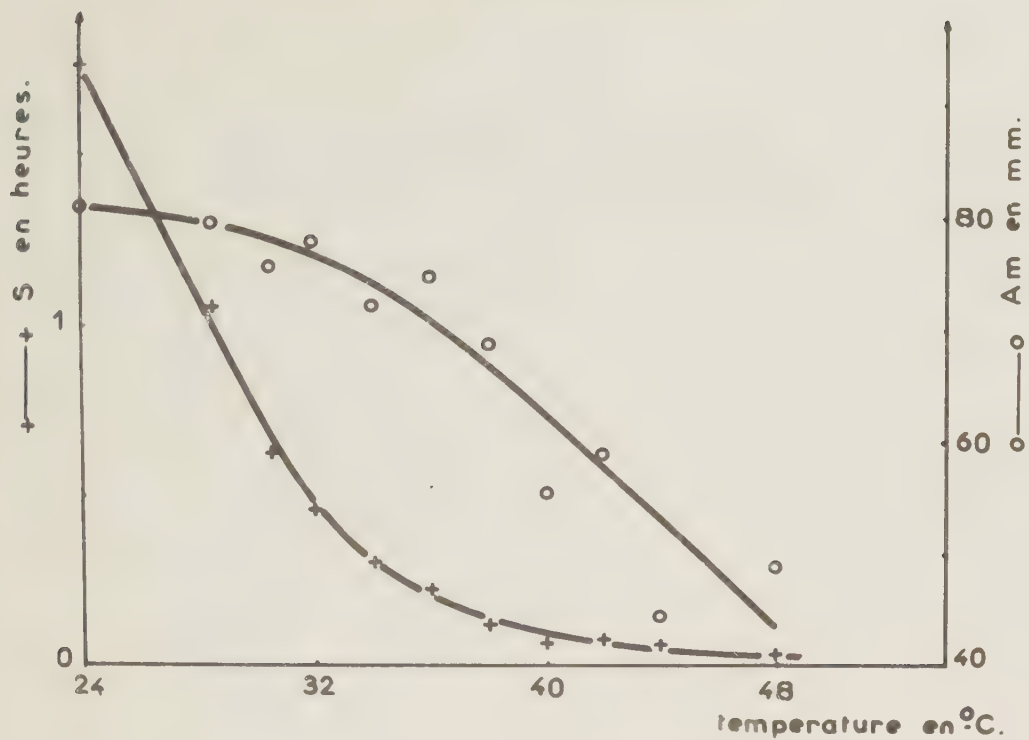


FIG. 26 : Influence de la température sur l'évolution des propriétés mécaniques du coagulum.

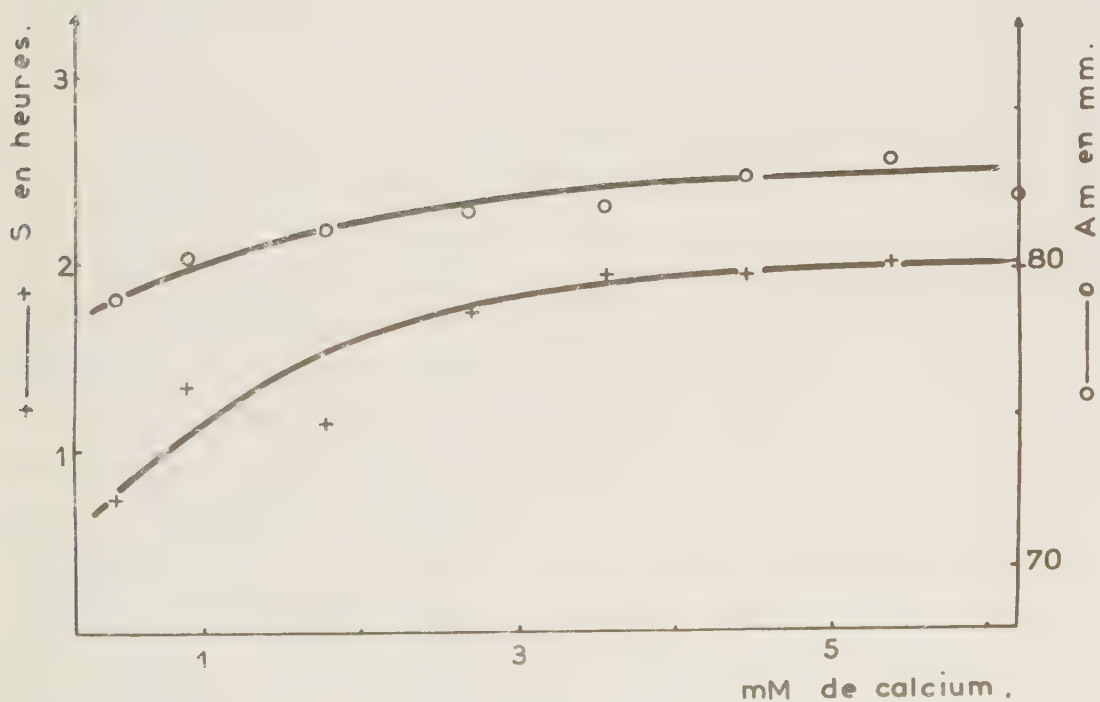


FIG. 27 : Influence de la concentration en calcium sur l'évolution des propriétés mécaniques du coagulum.

TABLEAU 26 - INFLUENCE DE L'ACIDIFICATION SUR LE TEMPS DE FLOCCULATION
ET LA VITESSE DE FORMATION DU COAGULUM.

N° de l'essai	pH	r	k
1	6,55	15 mn	31 mn
2	6,34	5 mn 24 sec	9 mn 30 sec
3	6,1	3 - 18 -	5 - 15 -
4	5,91	2 - 42 -	4 - 30 -
5	5,75	1 - 54 -	3 - -
6	5,64	2 -	3 - 15 -
7	5,5	1 - 24 -	2 - 30 -
8	5,43	0 - 48 -	2 -
9	5,35	0 - 30 -	2 -

A pH 6,55 le temps de floculation est de 15 mn mais on n'observe pas de rétraction du tracé au bout de 10 heures. De plus on ne constate pas d'exsudation de sérum après 24 heures dans le tube où a été fait l'empréurage. A pH 6,34 et 6,10 il n'y a pas non plus de rétraction du tracé au bout de 10 heures mais on peut observer une exsudation de sérum après 24 heures ; par contre à pH 5,91 on observe un début de rétraction au bout de 5h 2 mn, en même temps qu'une forte exsudation de sérum après 24 h. La figure 28 montre les variations du temps au bout duquel la rétraction commence à se produire (paramètre S) et de l'amplitude maximale Am en fonction du pH, dans la zone où il est possible de faire des mesures relativement rapides, de 5,3 à 5,9. La rétraction a lieu d'autant plus tôt que le pH est plus bas ; pour le dernier essai à pH 5,35 elle commence 9 mn 30 seulement après l'empréurage. Le paramètre Am diminue également avec le pH mais pas de la même manière que pour S. La diminution est d'abord lente, puis devient rapide à partir de pH 5,6. La diminution du pH et l'augmentation de la

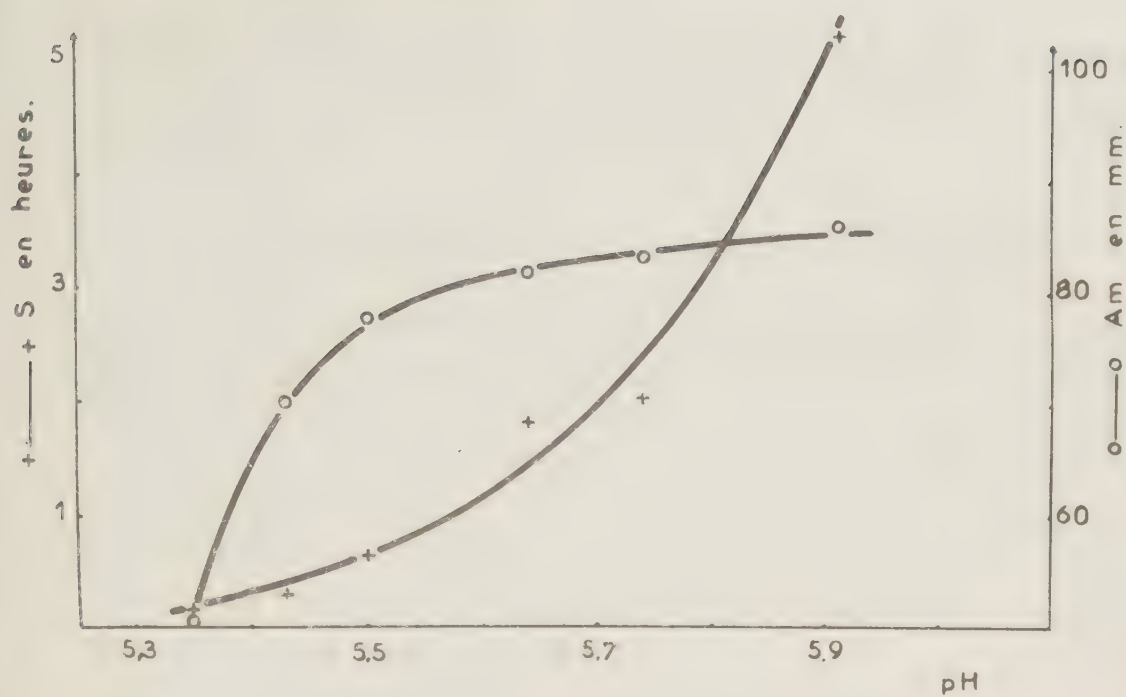


FIG. 28 : Influence du pH sur l'évolution des propriétés mécaniques du coagulum.

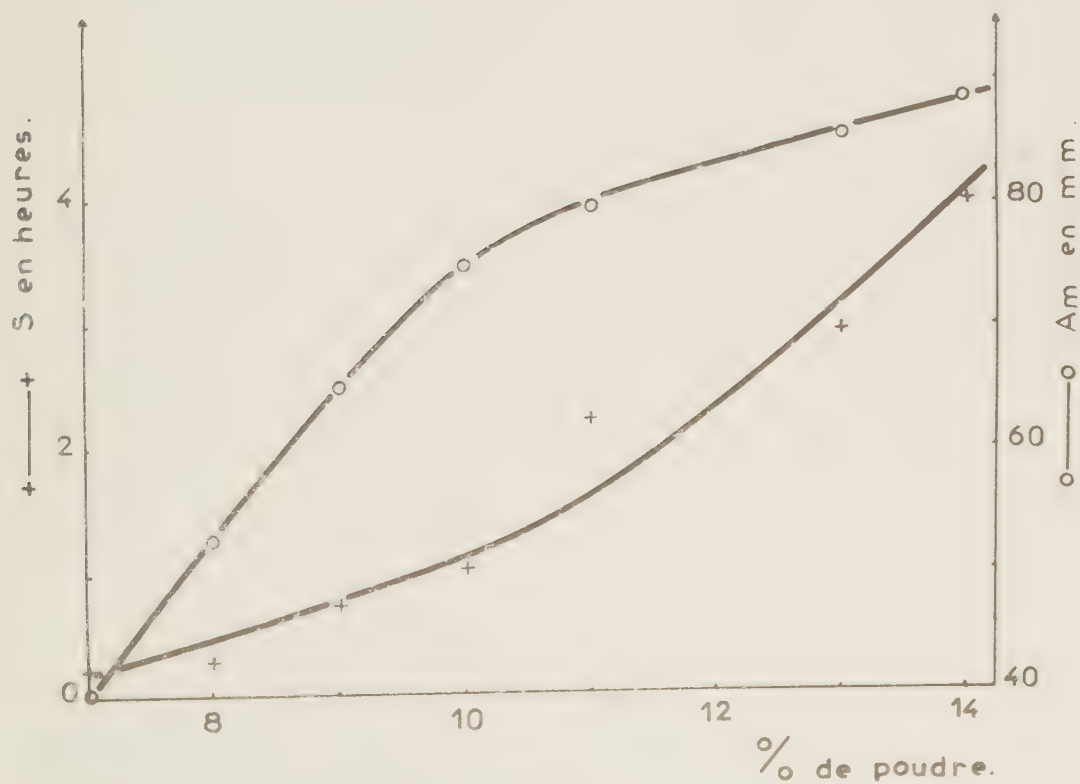


FIG. 29 : Influence de la concentration en matière sèche sur l'évolution des propriétés mécaniques du coagulum.

température ont des effets comparables : elles accélèrent l'apparition de la rétraction et semblent provoquer une diminution rapide de la fermeté du coagulum.

5 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERE SECHE.

Le lait utilisé est du lait reconstitué à des concentrations variables et additionné d'une quantité de chlorure de calcium proportionnelle à l'extrait sec (2,7 mM pour le lait à 10 %). Les essais sont réalisés à pH 5,5 et à 35° en gardant constante la quantité de présure utilisée. Comme les expériences ont lieu à un pH assez bas les temps de floculation sont très faibles de même que les valeurs du paramètre k. Le tableau 27 indique que le temps de floculation diminue d'abord avec l'augmentation de la concentration puis augmente, mais ses variations sont faibles. Le paramètre k, diminue régulièrement dans les essais réalisés.

TABLEAU 27 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERE SECHE SUR LE TEMPS DE FLOCULATION ET LA VITESSE DE FORMATION DU COAGULUM.

% de poudre	r	k
8	1 mn 54 sec	2 mn 09 sec
9	1 mn 49 sec	1 mn 42 sec
10	1 mn 45 sec	1 mn 33 sec
11	1 mn 45 sec	1 mn 24 sec
12	1 mn 45 sec	1 mn 21 sec
13	2 mn 09 sec	1 mn 21 sec

La figure 29 montre que le temps nécessaire pour obtenir le début de la rétraction augmente avec la teneur en matière sèche du lait. Elle indique également que l'amplitude maximale A_m évolue dans le même sens que S mais d'une manière différente ; elle augmente rapidement pour des taux de 7 à 10 %, puis plus lentement au dessus de cette dernière concentration qui correspond à celle d'un lait normal.

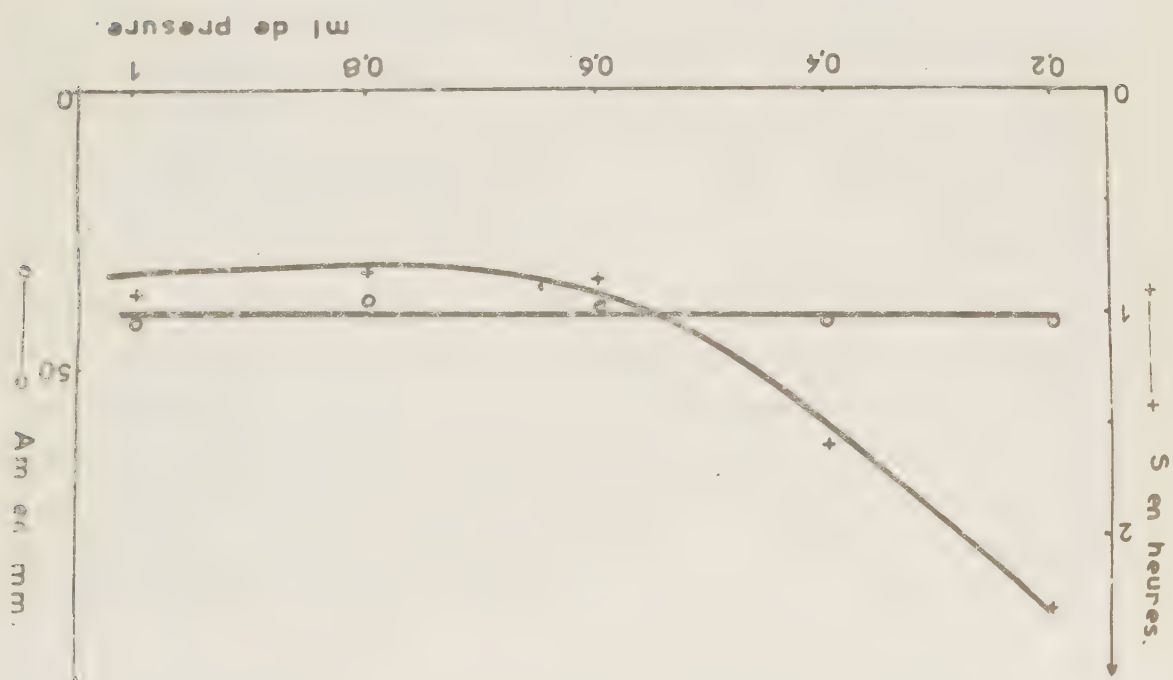
6 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PRESURE.

Le tableau 28 indique les variations des paramètres r et k en fonction de la quantité de présure utilisée. On peut constater que le temps de floculation diminue et que la vitesse de formation du coagulum augmente avec l'accroissement de la concentration en enzyme. La rétraction du tracé thrombélastographique est d'abord favorisée par l'augmentation de la dose de présure, S diminue assez rapidement, puis, à partir d'une certaine concentration en enzyme (0,6 ml de la solution tamponnée pour 100 ml de lait reconstitué à 10 %), la valeur de ce paramètre ne change plus. Par contre, il est évident que les propriétés mécaniques du coagulum, représentées par A_m , ne sont pas influencées par la dose de présure, dans l'intervalle considéré (figure 30).

TABLEAU 28 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN PRESURE SUR LE TEMPS DE FLOCULATION ET LA VITESSE DE FORMATION DU COAGULUM.

ml de solution de présure	r	k
0,2	23 mn 45 sec	16 mn 30 sec
0,4	12 mn 45 sec	9 mn
0,6	9 mn	7 mn 15 sec
0,8	5 mn 15 sec	4 mn 45 sec
1,0	4 mn 15 sec	4 mn

FIG. 30 : Influence de la concentration en enzyme sur les propriétés mécaniques du coagulum.



L'enrichissement en substances solubles du sédiment de lait concentré par rapport au sédiment de lait normal est le résultat de deux phénomènes. Le premier est une minéralisation accrue des micelles protéiques par déplacement de l'équilibre salin du lait vers la phase colloïdale (KANNAN et JENNNESS 1961, VUJICIC et DEMAN 1966, PYNE 1962, ALAIS et TARODO 1970), le deuxième est une concentration en sels et en lactose de la phase aqueuse du lait et donc de l'eau d'hydratation du phosphocaseinate. L'examen électrophorétique des sédiments d'ultracentrifugation et l'absence de variations de la teneur en eau d'hydratation des protéines à la suite la concentration, indiquent que l'aggrégation des micelles ne modifie pas la constitution et la conformation de la particule initiale. Elle est simplement le résultat d'un rapprochement de micelles stabilisé par des liaisons ioniques ou salines, ces dernières étant rendues possibles par l'augmentation de la quantité de phosphate de calcium colloïdal.

La faible diminution de la quantité d'eau d'hydratation du phosphocaseinate produite par un accroissement du champ centrifuge de 68000 à 198000 x g est due à l'élimination par tassement de l'eau intermicellaire qui accompagne les particules au cours de leur sédimentation. Ceci est confirmé par le fait que la somme des eaux d'hydratation des différentes fractions obtenues par sédimentation fractionnée est toujours supérieure à la fraction unique correspondant à la sédimentation de l'eau d'hydratation de la fraction la plus sensible dans le lait normal pour lequel ces deux fractions représentent 85 % du sédiment total, que dans le lait concentré où elles ne représentent que 42 % du sédiment total. L'eau restante, (plus de 95 % de l'eau mesurée à 68000 x g), est liée aux caséines par des forces suffisamment importantes pour accompagner le phosphocaseinate malgré leurs densités différentes (1,3 pour le phosphocaseinate). On peut donc considérer cette "d'hydratation", avec CREAMER et WAUGH (1966) et THOMPSON et COL (1969) comme une caractéristique du lait. L'organisation des molécules d'eau à

l'intérieur des particules protéiques et à leur surface décroît très vite quand on s'en éloigne et il est vraisemblable qu'elle n'intéresse que les premières couches moléculaires d'eau. Les molécules les plus éloignées étant de moins en moins liées et pouvant être enlevées dans certaines conditions (pH, addition de calcium, etc...). Les résultats que nous avons obtenus en ce qui concerne l'eau liée mesurée par cryoscopie, qui ne joue pas le rôle de solvant habituel de l'eau vis à vis de la substance d'addition (saccharose), indiquent qu'elle ne constitue qu'une partie de l'eau d'hydratation. Elle doit être constituée par la couche d'eau liée directement aux molécules protéiques, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur des micelles et agrégats de micelles. En effet, les vides intra-micellaires, perméables à de grosses molécules comme la carboxypeptidase A (RIBADBAU DUMAS et GARNIER 1969), sont normalement remplis d'eau et leur surface, aussi hydrophile que la surface externe des micelles, est tapissée de la même manière par des molécules d'eau liées à un ou plusieurs groupements polaires. Ces molécules peuvent en outre être liées entre elles par des liaisons hydrogène. Si les quatre liaisons de ce type que peut établir chaque molécule d'eau sont effectivement réalisées, et étant donné leur orientation dans le champ créé par le groupement polaire protéique, ces molécules ne se lieront que très difficilement à une particule de soluté étranger. Elles auront perdu leur rôle de solvant d'autant plus que les molécules de soluté ajoutée seront plus grosses ; c'est pourquoi on mesure de plus en plus d'eau liée par cryoscopie quand on utilise des solutés de poids moléculaires de plus en plus élevés.

Les couches de molécules d'eau suivantes, qui peuvent encore être reliées à la molécule protéique par l'intermédiaire de la première couche d'eau, mais qui possèdent la possibilité d'établir une ou plusieurs liaisons avec des particules d'un autre soluté, sont capables de les dissoudre et ne font pas partie de l'eau liée ; elles constituent une fraction de l'eau d'hydratation.

D'après NEMETHY et SCHERAGA (1962) et SCHERAGA (1963), dans l'eau liquide 56 % des molécules seraient encore liées par des liaisons hydrogène et maintenues sous formes d'amas fluctuants, dénommés "flickering clusters" par FRANK et WEN (1957), à 70°. Leur existence et leur désaggrégation sont fonction des fluctuations locales d'énergie et si leur existence est brève dans l'eau pure (10^{-11} sec d'après FRANK et WEN 1957) on peut penser qu'au

contact du soluté leur durée de vie est augmentée (NEMETHY 1968). On peut donc admettre qu'à l'intérieur des vides intramoléculaires leur durée de vie est plus longue et qu'une partie de ces "clusters", entraînée avec le phosphocaseinate au cours de sa centrifugation, fait partie de l'eau d'hydratation et peut être même de l'eau liée. Le fait que l'eau d'hydratation augmente quand la température de la centrifugation diminue, mis en évidence par THOMPSON et col (1969 a et b) est en faveur de cette hypothèse car la portance des "clusters" est accrue par la diminution de la température (NEMETHY et SCHERAGA 1962).

L'eau d'hydratation apparaît comme étant très sensible aux variations de pH au dessus de 6,0 et au dessous de 5,0, ce qui est une des causes des grandes variations des résultats analytiques que nous avons constatés dans des laits individuels. On peut admettre que les particules protéiques s'entourent d'autant plus d'eau que leur charge est plus élevée et exercent de ce fait un effet attractif à plus longue distance. L'augmentation de l'hydratation que l'on observe quand le pH décroît vers 5,8 - 5,6 doit correspondre à une modification de la charge des micelles de caséine puisqu'à une fragmentation des particules et une augmentation de la surface contact protéines-solvant. La constance de l'eau liée proprement dite, effet, n'est pas compatible avec une telle augmentation de surface.

Dans le cas de l'addition de calcium l'eau liée augmente rapidement et devient même supérieure à l'eau d'hydratation alors que le pH décroît. Il est vraisemblable que des interactions se produisent entre le solvant et les ions ajoutés pour donner naissance à des ions hydratés. Les molécules d'eau sont réparties autour des ions comme autour des particules protéiques et, bien qu'elles ne soient pas définitivement liées à l'ion (FRANCK et WEN 1957, SCHERAGA 1965), le temps pendant lequel elles se trouvent immobilisées est beaucoup plus important que leur temps d'immobilisation dans l'eau pure et on peut penser qu'elles sont mesurées avec l'eau liée aux protéines par la méthode cryoscopique. Par contre elles ne sont pas diminuées par les champs centrifuges utilisés, ce qui explique les résultats observés où l'eau liée paraît être supérieure à l'eau d'hydratation.

L'augmentation de l'eau d'hydratation avec l'addition d'hydrate de calcium alors qu'il y a en même temps accroissement du pH, est liée à l'importance accrue de la charge des protéines qui ont tendance à se disperser. L'augmentation de surface qui en résulte favorise l'hydratation. Au contraire la

réunion des micelles en agrégats de plus grande taille qui se produit quand on ajoute du chlorure de calcium au lait, agrégation observée au microscope électronique (Hostettler et Imhof 1953), est défavorable à l'hydratation. Les résultats obtenus avec le lait privé de phosphate colloïdal confirment ce résultat puisque la dialyse effectuée entraîne aussi la dispersion du phosphocaséinate et l'augmentation de l'hydratation.

Les variations de l'eau liée avec l'augmentation de la teneur en matière sèche du lait procèdent d'un phénomène semblable mais les variations de pH sont beaucoup plus faibles. L'accroissement de la taille des micelles et agrégats de micelles fait qu'elles fixent moins d'eau liée et l'on doit considérer que la faible augmentation de l'eau d'hydratation résulte d'un emprisonnement purement mécanique dans les agrégats.

Les augmentations, légère pour l'eau d'hydratation, élevée pour l'eau liée, avec le chauffage, semblent indiquer que les liaisons entre les groupements protéiques et les molécules d'eau sont augmentées et stabilisées par le traitement thermique.

B - EFFETS DE LA CONCENTRATION.

Dans un lait normal, les quantités totales de calcium, magnésium, citrates et phosphates sont plus importantes que celles qui peuvent être maintenues en solution (PYNE 1962). En réalité, ces substances se trouvent sous deux formes en équilibre : la forme colloïdale, où les sels forment des complexes avec les caséines, que l'on désigne habituellement par le terme phosphocaséinate de calcium, et la forme soluble comprenant les ions et les sels non dissociés (KANNAN et JENNESS 1961, VUJICIC et DEMAN 1966).

La concentration du lait par évaporation d'eau provoque naturellement une augmentation de tous les constituants par unité de volume et entraîne en plus un déplacement de l'équilibre salin vers une insolubilisation accrue des sels et en particulier du phosphate de calcium. Cependant, ce déplacement de l'équilibre salin ne joue pas sur la totalité des ions supplémentaires apportés par la concentration ; on observe aussi une augmentation du calcium ionique et un accroissement supérieur des ions PO_4^{--} (VUJICIC et DEMAN 1966). Il s'ensuit une légère diminution du pH et une diminution de la stabilité du lait concentré à la chaleur. Celle-ci est certainement liée à la légère diminution d'eau liée que l'on a observé avec l'accroissement de la teneur en matière sèche (THOMPSON et col 1969, ALAIS et col 1970).

Le rapprochement des molécules de caséine ou de certaines chaînes latérales, l'élimination d'une partie de l'eau liée, l'évolution des équilibres salins de la phase soluble vers la phase colloïdale et l'accroissement des liaisons hydrogène et des liaisons hydrophobes provoqués par la concentration sont des facteurs qui entraînent nécessairement le masquage d'un assez grand nombre de groupes ionisables. Il s'ensuit la modification des courbes de neutralisation des laits concentrés par rapport aux laits normaux que nous avons observé (fig.18).

Si l'on compare les courbes obtenues avec les laits et les courbes obtenues avec des solutions de caséinates de sodium (figures 18 et 19) on constate qu'aux bas pH, au dessous de 4 pour les laits et les solutions de caséinate, comme pour les pH élevés, au dessus de 9,5 pour les laits et 8 pour les solutions de caséinate, les solutions les plus concentrées montrent une diminution de leur pouvoir tampon. Dans la zone acide ce sont les groupes carboxyliques et la première fonction de l'acide phosphorique qui interviennent ; dans la zone basique ce sont les groupes aminés, phénoliques, sulphydriles et guanidiques (BALWANT, RAI PURI et col 1968). Dans la zone intermédiaire, comprise entre pH 6 et pH 8, ce sont les groupements imidazole et la deuxième fonction de l'acide phosphorique qui sont neutralisés. Dans le cas des solutions de caséinate on n'observe pas de différences, dans cette zone de pH, entre les solutions différemment concentrées contrairement à ce qui a lieu dans le cas des laits. Pour ces derniers, le dédoublement des courbes de neutralisation est dû vraisemblablement à la préneutralisation de la deuxième fonction de l'acide phosphorique par le calcium en excès au cours de la concentration.

La diminution du point isoélectrique apparent de la caséine dans le lait concentré par rapport au lait normal est une caractéristique importante de ce lait, mais elle n'est pas due à une modification du point isoélectrique propre de la caséine ; en effet, dans les solutions concentrées de caséinate de sodium le point isoélectrique est analogue à celui que l'on observe avec les solutions diluées. Il semble que l'on ait affaire ici, comme dans le cas de l'absence de précipitation de la caséine à pH 4,6 mise en évidence dans le lait normal réfrigéré (au dessous de 4°) par FOX et ERNSTROM (1969), à une stabilisation de la caséine vis à vis du pH due à l'augmentation de la teneur du lait concentré en phosphate de calcium colloïdal. Cependant, quand la déminéralisation des caséines est complète, d'autres facteurs doivent intervenir pour assurer cette stabilité.

C - PROPRIETES DES CAILLES ACIDES.

Les pâtes fraîches obtenues par coagulation acide à partir de lait concentré sont différentes des pâtes normales. Elles sont plus riches en sels et en lactose et cet enrichissement a plusieurs causes. Il y a d'une part la reconstitution du lait au moment de la coagulation aux environs de 10-11 % d'extrait sec, c'est-à-dire à une teneur en matière sèche sensiblement plus élevée que celle d'un lait normal, proche de 9 %. Le sérum est nécessairement plus riche en sels et en sucre, donc la pâte est elle-même enrichie par rapport à une pâte normale. Il y a aussi, d'autre part, la "refixation" du calcium dans la pâte elle-même, que nous avons démontrée. En réalité, l'acidification du lait jusqu'à un pH de 4,8 conduit bien à une caséine déminéralisée, mais la conservation du produit à basse température, qui précède la coagulation dans le procédé paracurd, entraîne une refixation du calcium sur les caséines, comme l'ont montré FOX et ERNSTROM (1969) avec du lait normal. Il en résulte que la pâte fraîche, obtenue par une coagulation pratiquement instantanée d'un lait riche en extrait sec et dont le phosphocaseinate est fortement minéralisé, est elle même enrichie en matières minérales et en lactose et protéines du sérum.

En ce qui concerne les propriétés rhéologiques des caillés acides, on observe des différences notables selon leur mode d'obtention : les causes ne nous en sont pas clairement connues ; les différences de composition correspondent sans doute à des structures particulières variées, que nous nous proposons d'étudier par la suite. Un simple "lissage" à 50 kg/cm^2 permet d'obtenir avec les pâtes normales un produit dont la fermeté et la texture sont correctes et dans ce cas une homogénéisation sous haute pression à 200 kg/cm^2 est à rejeter car elle entraîne la liquéfaction. Les pâtes "Paracurd" ont un comportement opposé. L'homogénéisation, à condition de se placer au dessus de 25° , permet d'obtenir une fermeté d'autant plus grande que l'extrait sec est élevé, mais l'état obtenu est métastable.

L'extrait sec des pâtes "Paracurd" et la température du traitement n'interviennent pas seuls dans leur comportement. On a en effet obtenu par dilution à l'eau des pâtes de faible extrait sec qui présentaient une très bonne fermeté et qui n'étaient pas destabilisées par brassage. Il semble que la proportion relative d'extrait sec du sérum par rapport à celui de la pâte soit un facteur très important en ce qui concerne la texture et la fermeté des caillés acides. Un rapport élevé correspond toujours à une texture défavorable.

Nous n'avons pas trouvé de relation significative entre la teneur en eau d'hydratation et la texture des pâtes normales et "Paracurd". Aux pH de fabrication normaux des caillés lactiques, les différents résultats obtenus montrent que les caséines sont également hydratées quelle que soit la concentration du lait. Bien que nettement inférieure à ce qu'elle est à un pH de 6,6, l'hydratation des caséines reste cependant élevée aussi bien dans le lait acidifié (1,5 à 1,7 g par gramme de caséine à pH 4,8 - 5,2) que dans le caillé correspondant (1,4 à 1,5 g par g de caséine à pH 4,8 - 4,9).

D - COAGULATION ENZYMATIQUE ET SYNERESE.

Le temps de floculation d'un lait emprésuré est mesuré avec davantage de précision par la méthode conventionnelle d'observation de la floculation que par la méthode thrombélastographique ; cela se traduit par la mesure de paramètres "r" toujours plus grands que le temps de floculation visible. L'explication de ce décalage entre les deux méthodes est double. D'une part les variations de température qui se produisent au moment de l'introduction du lait dans la cuve ralentissent le déroulement de la phase enzymatique, d'autre part, et cela cause la plus grande partie de l'écart constaté, le thrombélastographe mesure un phénomène postérieur à la floculation : la première liaison des agglomérats de micelles entre eux capable de solidariser la cuve de mesure et le cylindre plongeur. En ce qui concerne la formation et l'évolution du coagulum, par contre, le tracé thrombélastographique a permis d'intéressantes observations. La comparaison de nos résultats avec les travaux effectués par de nombreux auteurs (SCHULZ 1951, BERRIDGE 1952, WHITEHEAD et HARKNESS 1954, SCHULZ et KLEY 1956, CLAEISSON et NITSCHMANN 1957, BEEBY 1959, LAWRENCE 1959, ALAIS 1962, CHEESEMAN 1962, DIMOV et MINEVA 1962, ALAIS 1965) permet de constater que l'évolution du tracé varie de la même manière que les propriétés mécaniques d'un caillé présure quand on modifie les conditions de la coagulation. L'enregistrement thrombélastographique permet aussi bien de suivre la formation du coagulum que sa synérèse, au moins pendant le début du phénomène dans ce dernier cas, ce qui est extrêmement intéressant. Tous les facteurs, physiques ou chimiques qui interviennent dans la coagulation du lait, exercent également une action sur la rétraction du coagulum et la séparation du sérum. Cependant, certains sont favorables à la coagulation et défavorables à la synérèse ; le tableau 28 schématise leur action.

TABLEAU 28 - ACTION DES PRINCIPAUX FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LA COAGULATION ET LA SYNERESE.

	Coagulation	Synérèse
Augmentation d'acidité	Favorable	Favorable
Augmentation de la température de coagulation	Favorable	Favorable
Augmentation de la concentration en calcium	Favorable	Défavorable
Augmentation de la concentration en matière sèche	Favorable ou défavorable (en fonction de la concentration en présure)	Défavorable
Augmentation de la concentration en présure	Favorable	Favorable ou nulle

Dans la pratique, on a à considérer l'abaissement du pH du lait plutôt que son augmentation ; comme il est favorable à l'action enzymatique de la présure et à la dissociation des sels de calcium, il entraîne une diminution importante des temps de floculation. Cependant, comme il provoque également la solubilisation progressive du phosphate de calcium colloïdal (phospho-caséinate de calcium) il conduit en même temps à une diminution des propriétés mécaniques du coagulum, ce qui est en accord avec les conclusions de Mr GANN et PYNE (1960). Cette diminution est assez lente jusque vers pH 5,6 ; elle devient plus rapide à mesure que le caractère lactique s'affirme. Il est à noter d'ailleurs que ce caractère lactique, c'est à dire la formation d'un caillé moins élastique et moins ferme, apparaît assez brusquement dans cette zone de pH.

La diminution du pH exerce aussi une action favorable sur la synérèse du coagulum et la séparation du sérum ; elles deviennent très rapides quand le pH atteint 5,5 et conduisent à des caillés secs, trop égouttés. La solubilisation du calcium colloïdal provoqué par l'acidification a en effet pour consé-

quence de faciliter les rapprochements entre les micelles ou les agrégats de micelles par l'établissement de liaisons secondaires comme les ponts hydrogène ou de liaisons disulfure.

Au contraire, le ralentissement de la rétraction, consécutif à l'augmentation de la teneur en calcium ou de l'extrait sec peut être la conséquence du masquage, du fait de la salification, de groupements qui seraient actifs pendant la synérèse (groupes serylphosphoriques ou deuxième groupe carboxyle des acides aminés dicarboxyliques). L'augmentation de l'extrait sec du lait et l'addition de chlorure de calcium entraînent simultanément un accroissement de la teneur en calcium soluble et en phosphate de calcium colloïdal et, par conséquent, provoquent l'augmentation du paramètre A_m qui représente la fermeté maximale atteinte par le coagulum.

Il est à noter que, dans le premier cas, vient s'ajouter l'effet propre de la matière sèche, c'est à dire du nombre de micelles de caséine par unité de volume. Dans ces conditions, et tant que le rapport présure/substrat reste supérieur à un certain seuil, les phénomènes de la phase primaire et de la coagulation sont accélérés. On doit considérer en effet que la réaction enzymatique de la présure dépend non seulement du rapport enzyme/substrat mais aussi de la dilution de l'enzyme et du substrat par unité de volume. D'après ALAIS (1965), le rapport enzyme/substrat peut être divisé par 4,5 par addition de phospho-caséinate sans que l'on note une variation significative du temps de floculation du lait. Par contre, si le rapport enzyme/substrat varie en même temps que la quantité d'enzyme par unité de volume, les temps de floculation obtenus sont nettement différents ; Le tableau 28 (paragraphe III.F.6) donne des exemples de ces variations pour une teneur en phosphocaséinate constante et une quantité de présure par unité de volume variable, alors que le tableau n° 27 (paragraphe III.F.5) montre au contraire le faible écart provoqué par la diminution du rapport enzyme/substrat quand la quantité de présure par unité de volume reste constante.

L'amélioration des propriétés mécaniques du coagulum quand la température de coagulation diminue est surprenante. On ne voit pas en effet d'explication physicochimique satisfaisante de ce phénomène, mis à part le fait que la diminution de la température, en ralentissant les phénomènes de coagulation et de rétraction du coagulum, permet aux micelles et agglomérats de micelles de mieux se souder entre eux pour donner un coagulum plus ferme. Ce résultat est d'ailleurs général : la majorité des facteurs favorables à

la synérèse du coagulum est défavorable à l'acquisition d'une grande fermeté, ce qui se traduit dans la pratique par un égouttage trop poussé avec une augmentation des pertes au sérum.

Dans le cas où l'on a fait varier la quantité de présure, la teneur du lait en phosphocaséinate restant constante, on a obtenu une accélération de la coagulation et de la synérèse mais la fermeté du coagulum n'a pas varié. Ceci semble montrer que l'augmentation de la quantité de présure ne joue que sur la rapidité avec laquelle s'établissent les liaisons entre les micelles de caséine, au cours de la coagulation, et non sur leur nombre maximal ou sur leur nature.

V - C O N C L U S I O N

L'étude de l'hydratation des caséines nous conduit à la conclusion que l'eau liée, mesurée par la méthode cryoscopique, est une partie de l'eau d'hydratation mesurée par ultracentrifugation. Il apparaît très difficile d'établir une frontière nette entre ces deux états : le choix du traceur, dans le cas de l'eau liée, a une très grande importance et peut dans certains cas donner une teneur en eau liée supérieure à l'hydratation obtenue par centrifugation. Il semble en réalité, qu'il existe, dans une suspension de macromolécules comme le phosphocaséinate de calcium dans le lait, tous les intermédiaires entre les molécules d'eau les mieux orientées et les plus fortement retenues par les protéines, et les molécules libres à un instant donné dans la solution, c'est à dire sans liaisons d'aucune sorte avec une molécule quelconque. Cependant, cette hétérogénéité de l'"eau d'hydratation", renforcée par le fait qu'elle peut même comprendre de l'eau emprisonnée mécaniquement dans les particules sédimentées, fait que ses variations sont la somme des variations des différentes fractions qu'elle contient et peuvent, par conséquent, ne pas représenter l'une d'entre elles en particulier. C'est ce que l'on peut observer quand on provoque la variation des facteurs qui interviennent sur la coagulation du lait par la présure et la synérèse du coagulum. Dans certains cas, l'eau liée et l'eau d'hydratation varient dans le même sens. Par exemple, la conservation à basse température du lait, la pasteurisation, l'enlèvement du phosphate colloïdal entraînent des variations parallèles. Dans d'autres cas, les variations sont opposées : addition de calcium, augmentation de l'extrait sec. Parfois l'eau d'hydratation varie seule c'est le cas de l'augmentation d'acidité. Il en résulte que l'action de l'eau liée ou de l'eau d'hydratation en tant que facteur de la coagulation et de la synérèse est souvent difficile à dégager. Il semble pourtant que c'est l'eau liée qui joue ici le plus grand rôle. Toutes les augmentations de l'eau liée sont en effet accompagnées d'un ralentissement de la coagulation (stockage à basse température, pasteurisation, enlèvement du phosphate colloïdal) ; au contraire, quand l'eau liée ne varie pas (modification du pH) ou diminue (augmentation de l'extrait sec), la coagulation est accélérée. Dans le cas de l'addition de calcium et de son action favorable sur la coagulation, l'intervention du phénomène de solvation des ions ne permet pas de conclure. En ce qui concerne

la synérèse, l'action de l'eau liée semble être secondaire vis à vis de l'addition de calcium et de l'augmentation de l'extrait sec. Il n'est donc pas possible de se contenter de la mesure de "l'eau d'hydratation" par ultracentrifugation dans l'étude d'un phénomène qui est susceptible de faire intervenir l'hydratation des caséines, il faut aussi mesurer l' "eau liée" par cryoscopie ou par toute autre méthode donnant des résultats concordants après vérification (Résonance magnétique nucléaire par exemple où l'on mesure l'eau non congelée à -18°C (0°F) (TOLEDO et col 1968).

L'étude des caillés obtenus par coagulation acide à partir de lait concentré redilué jusqu'à un taux supérieur à la normale au moment de la coagulation, nous a permis de montrer le comportement particulier de ce lait en fonction des principaux facteurs de la coagulation. Les caractéristiques les plus importantes paraissent être d'une part, toutes les modifications d'équilibre produits par la concentration et, d'autre part, l'augmentation de stabilité des caséines vis à vis de l'acidification.

Les modifications d'équilibre, qu'elles portent sur la répartition de différents sels entre les phases colloïdales et solubles ou sur l'insolubilisation progressive de la caséine micellaire, concourent à assurer un meilleur rendement fromager. Il faut d'ailleurs ajouter à ce sujet, que la concentration de la phase aqueuse elle même intervient dans le même sens. L'augmentation de stabilité des caséines vis à vis du pH peut être mise à profit dans certaines fabrications car elle peut permettre de se rendre maître du moment de la coagulation. Ce fait, joint au refroidissement après maturation qui permet une refixation de phosphate de calcium solubilisé par l'acidification, et aux autres qualités technologiques du lait concentré (facilité de stockage, accélération de la fabrication) plaide en faveur du développement de son utilisation en fromagerie. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour préciser le rôle du phosphate de calcium sur la stabilité à bas pH des caséines du lait concentré. Il est d'ailleurs probable que d'autres facteurs interviennent, comme par exemple l'augmentation de la quantité de caséine K par unité de volume ou la diminution du nombre de micelles et de leur surface. Ce sont des sujets que nous aborderons dans l'avenir.

VI - R E S U M E

Nous avons étudié la composition et la coagulabilité du lait reconstitué, la validité des méthodes utilisées pour le dosage des minéraux, la mesure de l'hydratation de la caséine, et l'importance des principaux facteurs qui interviennent sur la coagulation et la séparation du caillé et du sérum. Nous avons insisté plus particulièrement sur la méthode thrombélastographique pour la mesure des propriétés rhéologiques et sur la méthode cryoscopique pour la mesure de l'eau liée car elles nous semblent pouvoir rendre de grands services dans la pratique industrielle.

Nous avons montré que l'hydratation des micelles de phospho-caséinate variait peu dans les laits normaux et concentrés en fonction de leur densité ; sauf pour les micelles les moins denses qui sont beaucoup plus hydratées mais qui ne représentent qu'une très petite partie de l'ensemble. La comparaison entre l'eau d'hydratation mesurée par ultra centrifugation et l'eau liée mesurée par cryoscopie a fait apparaître des différences qui nous ont conduit à la conclusion que l'eau liée était une partie de l'eau d'hydratation. Cependant, du point de vue coagulation par la présure et synérèse du coagulum, l'eau liée semble avoir une importance plus grande que l'eau d'hydratation. En général l'augmentation de l'eau liée est défavorable à la coagulation et à la synérèse et réciproquement. Dans le cas de l'addition de calcium, l'intervention de la solvatation des ions ne nous a pas permis de conclure.

L'étude du lait concentré et de son utilisation dans la fabrication des caillés acides a fait apparaître des propriétés importantes au point de vue technologique. En particulier, le déplacement des équilibres salins vers la phase colloïdale et l'insolubilisation de la caséine non micellaire sont des facteurs qui peuvent entraîner une augmentation du rendement fromager. De plus, la propriété particulière du lait concentré de ne pas coaguler au pH de 4,9 - 4,8, peut être mise à profit en technologie pour se rendre maître du moment de la coagulation par élévation de la température.

VII - B I B L I O G R A P H I E

- ABELE J.E., Amer. J. Med. Electronics 2 (1963) 32
- ABELE J.E., Brewers digest (1965) 60
- ALAI S C., Thèse Paris (1962)
- ALAI S C., Industrie laitière n° 218 - 219 (1965) 1
- ALAI S C., STENNE P., Lait 45 (1965) 129
- ALAI S C., TARODO de la FUENTE B., Milchwissenschaft (1970) 514
- ALAI S C. Science du lait 3e ed. (1973) SEPAIC
- ALLEMANN O., Ann. Agric. Suisse 9 (1940) 936
- A.O.A.C. Official Methods of Analysis - 10e ed. (1965)
- ARDEBILI G.M., CAMUS A., JOUXIER X., Industrie laitière n° 214 (1964) 375
- BALWANT RAI PURI., TOTEJA K.K., MALIK R.C., J. Indian Chem Soc 45 (1968) 889
- BAMMAN E., NOVOTNY E., ROHR L., Chem. Ber. 81 (1948) 438
- BEEBY R., Aust J. Dairy Technology 14 (1959) 77
- BERRIDGE N.J., Nature 149 (1942) 194
- BERRIDGE N.J., The Analyst 77 (1952) 57
- BERRIDGE N.J., J. Dairy Res 19 (1952) 328
- BOHREN H.V., WENNER V.R., J. Dairy Sci 44 (1961) 1213
- BREVET SEFFAC (1964) Paris
- BURNETT J., SCOTT BLAIR G.W., Dairy Ind. 28 (1963) 220
- CHEESEMAN G.C., Int Dairy Cong B, section IV (1962) 465
- CHRISTEN C., VIRASORO E., Lait 12 (1932) 923
- CLAESSON O., NITSCHMANN H.S., Acta Agric. Scandinavia VII.4 (1957) 341
- CREAMER L.K., WAUGH D.F., J. Dairy Sci 49 (1966) 706
- DE MAN J.M., BATRA S.C., Dairy Ind 29 (1964) 32
- DILLIER-ZULAUF A., DOYOTTE J.P., Travaux de Chim. Al. et d'Hygiène 62 (1971) 32
- DIMOV N.D., MINEVA P., Int Dairy Cong B (1962) 817

- SCHERAGA H.A., The Proteins Edit. by Neurath. (1963)
- SCHERAGA H.A., Ann N.Y. Acad. Sci (1965) 253
- SCHALINATUS E., BEHNKE U., Milchwissenschaft 22 (1969) 601
- SCHMIDT D.G., Nizo Niews 11e serie (1965)
- SCHULZ M.E., Milchwissenschaft 6 (1951) 112
- SCHULZ M.E., KLEY W., Milchwissenschaft 11 (1956) 116
- SCOTT BLAIR G.W., COPPEN F., J.D. Res 11 (1940) 187
- SCOTT BLAIR G.W., BURNETT J. J.D. Res 30 (1963) 383
- SEEKLES L., SMEETS W.T.G.M. Lait 34 (1954) 610
- SMEETS W.T.G.M., Thèse Université, Utrecht (1952)
- SOMMER N. H., MATSEN H., J. Dairy Sci. 18 (1935) 741
- STUBBS J.R., The Analyst 60 (1935) 147 - 223 - 600 - 607
- TARODO de la FUENTE B., FRENTZ R., Lait 46 (1966) 371
- TARODO de la FUENTE B., ALAIS C., FRENTZ R., Lait 46 (1969) 400
- TARODO de la FUENTE B., TURKS., ALAIS C., HUTIN G., BRUNEAU J.C., Lait n° 509 -
510 (1971) 623
- THOMASOW J., Milchwissenschaft 23 (1968) 725
- THOMPSON M.P., BOSWELL R.T., MARTIN V., J. Dairy Sci 52 (1969) 796
- THOMPSON M.P., GORDON W.G., BOSWELL R.T., FARRELL H.M., J. Dairy Sci 52 (1969)
1166
- TOLEDO R., STEINBERG M.P., NELSON A.I., J. Food Sci 33 (1968) 383
- TOURNEUR C., DO NGOC C.U., LENOIR J., VEISSEYRER., Lait 467 (1967) 383
- TUSZYNSKI W.B., J. Dairy Res 38 (1971) 115
- VUJIC IC I., DEMAN J.M., Milchwissenschaft 21 (1966) 346
- WAKE R.G., BALDWIN R.L., Biochem Biophys Acta 47 (1961) 225
- WAUGH D.F., VON HIPPEL P.H., J. Amer Chem Soc 78 (1956) 4576
- WAUGH D.F., J. Phys Chem. (1961) 1793
- WAUGH D.F., CREAMER L.K., SLATTERY L.W., DRESDNER G.W., Biochemistry 9 (1970) 78
- WHITEHEAD H.R., HARKNESS W.L., Aust J. Dairy Technology 9 (1954) 103.

- ELSDON G.D., STUBBS J.R., *The Analyst* 59 (1934) 585
- FOX C.W., ERNSTROM C.A., *J. Dairy Sci* 52 (1969) 885
- FOX P.F., MORRISSEY P.A., *J. Dairy Res* 39 (1972) 387
- FRANK H.S., WEN W.Y., *Disc Faraday Soc* (1957) 133
- FRAZEUR D.R., *J. Dairy Sci* 50 (1967) 938
- FRENTZ R., *Lait* 45 (1965) 489
- GORTNER R.A., *Annual Review of Biochemistry* VI (1932)
- GUTHY K., KIERMEIER F., *Z. Lebensm-Untersuch-Forsch* 145 (1971) 273
- GUTHY K., KIERMEIER F., *Z. Lebensm-Untersuch-Forsch* 148 (1972) 117
- HAMMARSTEN O., *Jahresber - Fortschr - Thierchem* 4 (1874) 135
- HANSSON E., SJOSTRÖM G., SAMUELSSON E.G., *XII Int Dairy Cong* II (1949) 59
- HARRIS J.A., *Amer. Jour. of Botany* 12 (1925) 499
- HARTERT H., *Klin Wochenschr* 26 (1948) 577
- HENNINGSON R.A., *J. of the A.O.A.C.* 51 (1968) 816
- HOSTETTLER H., IMHOF K., *Milchwissenschaft* 6 (1951) 351
- HOSTETTLER H., IMHOF K., *Ann. Agric. Suisse* 66 (1952) 307
- HOSTETTLER H., IMHOF K., *Int. Dairy. Cong* 2 (1953) 423
- HUTIN G., STENNE P., *Technique Laitière* n° 463 (1964) 13
- JACQUET J., MARCAIS H., *C.R. Ac. Agric.* 50 (1964) 1272
- JEN S.J., ASHWORTH U.S., *J. Dairy Sci.* 53 (1970) 1201
- JOLLES J., ALAIS C., JOLLES P., *Helvetica chimica Acta* 53 (1970) 1918
- KANNAN A., JENNESS R., *J. Dairy Sci* 44 (1961) 808
- KAUZMANN W., *The mechanism of enzyme action* ed. by Elroy et Glass, John Hopkins Press Baltimore Maryland (1954)
- KAUZMANN W., *Adv. Protein chem.* 14 (1959) 1
- KLOTZ I.M., *Science* (1958) 815
- KOLTZ I.M., LUBORSKY X.W., *J. Am Chem Soc* 81 (1959) 5119
- LAWRENCE A., *Aust J. Dairy Technology* 14 (1959) 166
- LINDEN G., *Ind Al. Agr.* n° 6 (1971) 793

- Mc DOWALL H.F., DOLBY R.M., J. Dairy Res. 7 (1936) 2
- Mc GANN T.C.A., PYNE G.R., J. Dairy Res. 27 (1960) 403
- Mc KENZIE H.A., Adv. Prot. Chem. 22 (1967) 55
- MAUBOIS J.L., MOCQUOT G., BLANC-PATIN E., Ind Laitière 222 (1965) 309
- MOCQUOT G., C.R. Aca. Sci. 221 (1945) 121
- MOCQUOT G., Le Lait n° 269 - 270 (1947) 576
- MOCQUOT G., SCOTT BLAIR G.W., BARON M., Dairy Industries (Octobre 1947)
- MURTHY G.K., RHEA U., J. Dairy Sci 50 (1967) 313
- N., Industrie laitière n° 226 (1965)
- NEMETHY G., SCHERAGA H.A., J. Chem Phys. (1962) 3382
- NEMETHY G. Low Temperature biology of foods tuffs. Ed. by Hawthorn and Rolfe. Pergamon Press. Oxford (1968)
- NEWTON R., GORTNER R.A., Bot. gaz. 74 (1922) 442
- NICLOUX M., GOSSELIN Bull Soc. Chim. Biol. 16 (1934) 338
- NICLOUX M., Bull. Soc. Chim. Biol. 16 (1934) 822
- NITCHMANN H.S., KELLER W., Helv. Chim. Acta 28 (1945) 942
- NITSCHMANN H.S., Helv. Chim. Acta 32 (1949) 1258
- OWADES J.L., HARRIS A.F., Proc. Am. So. Brewing Chemists (May 1964) 60
- PIEN J., Lait n° 477 (1968) 433
- PIEN J., Lait n° 483 - 484 (1969) 175
- PLINT M.A., BURNETT J., SCOTT BLAIR G.W., Dairy Ind 32 (1967) 104
- PULAY G., CSOK J., BAKOS A., Int Dairy Cong VIF (1971) 333
- PYENSON H., DAHLE C.D., J. Dairy Sci 21 (1938) 169
- PYNE G.T., Mc GANN T.C.A., J.D. Res 27 (1960) 9
- PYNE G.T., J.D. Res 29 (1962) 101
- RIBADEAU DUMAS B., GARNIER J., C.R. Acad Sci (1969) 2504
- SABARWAL P.K., GANGULI N.C., Indian J. Dairy Sci 24 (1971) 16
- SAINCLIVIER M., Ann. de Technologie n° 2 (1959) 155

